

GISELLE DE FARIA ROMERO SOLDI

Avaliação da resistência aos inibidores da protease em pacientes vivendo com HIV em falha terapêutica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando de Macedo Brígido.

SÃO PAULO

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Soldi, Giselle de Faria Romero.

Avaliação da resistência aos inibidores da protease em pacientes vivendo com HIV em falha terapêutica/ Giselle de Faria Romero Soldi. – 2019.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Pesquisa laboratorial em Saúde Pública.
Orientação: Prof. Dr. Luis Fernando de Macedo Brígido

1. HIV. 2. Inibidores da protease de HIV. 3. Antirretrovirais. 4. Resistência.

SES/CCD/CD-390/2019

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me proporcionado todas as oportunidades que tive até aqui, sempre estando ao meu lado e me dando todas as forças necessárias para conseguir vencer cada nova etapa da minha vida.

Agradeço também ao meu marido, por estar sempre presente ao meu lado, me incentivando, me ajudando e acreditando no meu potencial. Aos meus pais, avós e ao meu irmão, que estiveram na torcida pelo meu sucesso diariamente durante este período, me incentivando e apoiando.

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram na realização deste trabalho, em especial ao meu orientador, Dr. Luís Fernando de Macedo Brígido, e aos funcionários e estagiários do Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais do Instituto Adolfo Lutz, que muito me ensinaram e auxiliaram no decorrer deste projeto.

As meninas Isadora, Cintia, Luana e Laís pela amizade, companheirismo e ajuda a cada dia que passamos no laboratório.

Também deixo minha gratidão para o Programa de Pós-Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças (PPG-CCD) e para a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por terem possibilitado os meus estudos durante o mestrado.

RESUMO

Inibidores de protease (IP) são importantes nos esquemas de resgate para pacientes que não respondem à terapia antirretroviral (TARV). O uso prévio de IP pode limitar o tratamento e a detecção de mutações de resistência a estes medicamentos (IP-DRM) e pode subsidiar a seleção do regime. O objetivo deste estudo consistiu em descrever as mutações principais para os IP em pacientes do Estado de São Paulo, expostos a pelo menos um IP e que estavam falhando à terapia antirretroviral, para avaliar os preditores do surgimento de IP-DRM e o possível impacto dos subtipos do HIV-1 na resistência. Foram avaliadas sequências parciais do gene da polimerase do HIV-1 (RNA - Sequenciamento de Sanger) de 1696 pacientes em falha virológica, com genotipagem entre 2014 e 2017. Mutações de resistência aos antirretrovirais (Drug Resistance Mutations - DRM), susceptibilidade aos antirretrovirais (Genotypic Susceptibility Score – GSS) e subtipo viral, juntamente com os parâmetros clínicos e laboratoriais, foram avaliados utilizando-se regressões logísticas para acessar os preditores do surgimento de DRM e sua relação com os subtipos do HIV-1 circulantes em São Paulo (B, C e F). No total, 466 sequências apresentaram pelo menos uma IP-DRM (27,5%), mais comumente nos códons M46 (14,7%; 250/1696), V82 (13,8%; 234/1696) e I54 (13,3%; 225/1696). Mutações para as classes dos ITRN e ITRNN estavam presentes em 69,9% (1181) e 59,9% (1016), respectivamente, das 1696 sequências analisadas. De todas as sequências, 1496 (88,2%) tiveram predição de atividade plena ao darunavir (DRV), mas apenas 57,1% das sequências com pelo menos uma IP-DRM tiveram atividade plena ao DRV (266/466). A presença de IP-DRM teve associação ($p < 0,05$) com maior tempo em tratamento, presença de mutações para os ITRN, uso de algum IP e com o subtipo F. Sequências de subtipo C tiveram menor quantidade de IP-DRM (10%; 9/87) em comparação com as de subtipo B (28%; 338/1216) e de subtipo F (35%; 58/168) ($p < 0,001$), mas a análise ajustada sugere que esta associação não foi independente do tempo de tratamento mais curto e de menos esquemas utilizados por pacientes com HIV-1 C (OR: 0,59; IC 95: 0,2 – 2,5; $p = 0,48$). HIV-1 F, juntamente com presença de mutações para os ITRN e maior tempo em tratamento estão associados com a presença de IP-DRM, com GSS mais baixo para o DRV e com a presença de mutação no códon I50. Entre pacientes com IP-DRM, a atividade plena ao DRV foi comprometida e esforços para detectar precocemente a falha são necessários, particularmente para o subtipo F do HIV-1, que mostrou associação com o surgimento de resistência e potencial impacto na susceptibilidade aos IP. Além disso, os resultados sugerem que as mutações para os ITRN podem servir como indicativo de um nível minimamente suficiente de adesão terapêutica, que permita o surgimento de IP-DRM.

Palavras-chave: HIV-1, Inibidores da Protease do HIV, Antirretrovirais, Resistência

ABSTRACT

Protease inhibitors (PI) are important in the salvage regimens for patients failing antiretroviral therapy (ART). Previous PI use may limit treatment and the detection of PI drug resistance mutations (PI-DRM) may subsidize the regimen selection. The aim of this study was to describe the major PI mutations among patients from São Paulo State, exposed to at least one PI and failing antiretroviral therapy to evaluate the predictors of mutation emergence and the possible impact of HIV-1 subtypes on resistance. Were evaluated HIV-1 partial polymerase sequences (RNA - Sanger sequencing) from 1696 patients on virological failure, genotyped between 2014 and 2017. Drug resistance mutations (DRM), antiretroviral susceptibility (Genotypic Susceptibility Score – GSS) and virus subtype, along with clinical and laboratory parameters, were evaluated using logistic regressions to access the predictors of mutations emergence and its relation with the circulating HIV-1 subtypes (B, C and F) in São Paulo State. A total of 466 sequences showed at least one PI-DRM (27.5%), most commonly M46 (14.7%; 250/1696), V82 (13.8%; 234/1696) and I54 (13.3%; 225/1696). Mutations to NRTI and to NNRTI drug classes were present in 69.9% and 59.9%, respectively, of the 1696 analyzed sequences. Full activity to darunavir was predicted for 88% of the patients (1496/1696), but it was only 57% among those with at least one PI-DRM (266/466). Presence of a PI-DRM was associated ($p < 0.05$) to longer total time on treatment, presence of a NRTI mutation, use of any PI and subtype F. Subtype C sequences had less major PI-DRMs (10%, 9/87) compared with B (28%, 338/1216) or F (35%, 58/168) ($p < 0.001$) but adjusted analysis suggested that this association was not independent from a shorter treatment time and fewer regimens (OR 0.59, Confidence Interval 95: 0.2 - 2.5, $p = 0.48$). Subtype F, together with NRTI mutations and longer time on treatment was associated with the presence of PI-DRM, with a lower darunavir GSS and with mutations at codon I50. Among patients with PI-DRM, the full activity to darunavir was compromised in many cases and efforts to detect the failure at earlier time are warranted, particularly for HIV-1 subtype F that showed association with the emergence of resistance, with potential impact in protease inhibitors sequencing. Furthermore, the results suggest that NRTI mutations may serve as an indicative of a minimally sufficient level of therapy adherence to allow PI-DRM emergence.

Key words: HIV-1, HIV Protease Inhibitors, Antiretrovirals, Resistance

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

(F)	Foward
(R)	Reverse
/r	Antirretroviral com Ritonavir
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro (10 ⁻⁶ Litro)
3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Antirretroviral
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
CCR5	Correceptor de membrana
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CD4	Receptor de membrana
CDC	Center for Disease Control
cél/mm³	Células por milímetro cúbico
CPR	Calibrated Population Resistance
CV	Carga Viral
CXCR4	Correceptor de membrana
D4T	Estavudina
DDI	Didanosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Deoxirribonucleosídeo trifosfatado

ddNTP	Dideoxirribonucleosídeo trifosfatados
DRM	Drug resistance mutation
DRV	Darunavir
DTG	Dolutegravir
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenediaminetetracético
EFV	Efavirenz
ENV	Envelope viral
ETR	Etravirina
EVG	Elvitegravir
FDA	Food and Drug Administration
FPV	Fosemprenavir
FTC	Emtricitabina
GAG	Grupo Específico de Antígenos
gp	Glicoproteína
GSS	Grau de Susceptibilidade
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Human T-Lymphotropic Virus
IAS – USA	International Antiviral Society
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IDV	Indinavir
INI	Inibidor de integrase
IN	Integrase
IP	Inibidor da Protease
ITRN	Inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleotídeo

ITRNN	Inibidor de transcriptase reversa não-análogo de nucleotídeo
LAV	Lymphadenopathy associated virus
LPV	Lopinavir
M	Major
MgSO4	Sulfato de Magnésio
mL	Mililitro (10 ⁻³ Litro)
mM	Milimolar
MVQ	Maraviroque
N	New ou Non-M -Non-O
NC	Novas Classes
NCBI	Centro Nacional para Informação Biotecnológica
NEF	Fator de regulação negativa
NFV	Nelfinavir
ng	Nanograma (10 ⁻⁹ Grama)
NVP	Nevirapina
O	Outlier
p	Proteína
P	Putative
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PCP	<i>Pneumocystis carinii</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEP	Profilaxia Pós Exposição
POL	Polimerase
PrEP	Profilaxia Pré Exposição
PT	Protease

R5	Vírus com tropismo pelo correceptor CCR5
RAL	Raltegravir
REV	Regulador da expressão de proteínas virais
RNA	Ácido ribonucleico
RNase H	Ribonuclease H
rpm	Rotações por Minuto
RT	Transcriptase Reversa
RT-PCR	Retrotranscrição e Reação em Cadeia da Polimerase
SICLOM WEB	Sistema de Controle Logístico de Medicamentos
SQV	Saquinavir
Stop Codon	Parada de Leitura
TARV	Terapia antirretroviral
TAT	Trans-ativador transcricional
TCD4	Linfócito T auxiliar
T-20	Enfuvirtide
TBE	Tris, Ácido Bórico, EDTA
TDF	Tenofovir
TPV	Tipranavir
U	Unidade
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/aids
VIF	Fator de infectividade viral
VPR	Proteína viral R
VPU	Proteína viral U
VPX	Proteína viral X
WHO	World Health Organization
X4	Vírus com tropismo pelo correceptor CXCR4

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da partícula viral do HIV em corte transversal	19
Figura 2: Esquema representativo da organização do genoma do HIV-1	21
Figura 3: Esquema representando o ciclo de replicação do HIV-1	26
Figura 4: Ilustração da meta a ser atingida em 2020 para o diagnóstico e tratamento de pessoas que vivem com o HIV	27
Figura 5: Esquema de seleção das sequências parciais do gene da polimerase do HIV-1 analisadas no estudo	45
Figura 6: Mutações de resistência principais em pacientes com falha virológica expostos a pelo menos um Inibidor da Protease.....	60
Figura 7: Percentual de sequências parciais do gene da polimerase do HIV-1,por subtipo (B, C e F), de acordo com o grau de susceptibilidade (GSS) aos antirretrovirais Atazanavir (ATV), Darunavir (DRV) e Lopinavir (LPV) de pacientes com viremia detectável, expostos a pelo menos um inibidor da protease (IP).....	63
Figura 8: Número de mutações por sequência, de acordo com o subtipo na polimerase (protease + transcriptase reversa) do HIV-1 e com o tempo de tratamento dos pacientes...	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Siglas e nomes genéricos dos medicamentos das classes ITRN e ITRNN	29
Tabela 2: Siglas e nomes genéricos dos medicamentos da classe IP	30
Tabela 3: Siglas e nomes genéricos dos medicamentos de Nova Classe.....	30
Tabela 4: Esquemas de TARV inicial preferencial para adultos. Fonte: Brasil, 2018.	36
Tabela 5: Esquemas de ARV para resgate da falha inicial em adultos.Fonte: Brasil, 2018..	37
Tabela 6: Medicamentos de escolha para compor o esquema de resgate da falha inicial. Fonte: Brasil, 2018	38
Tabela 7: Medicamentos para composição da TARV de resgate para múltiplas falhas aos ARV.....	39
Tabela 8: Detalhamento do protocolo de RT-PCR utilizado no laboratório para amplificação da região da polimerase (protease + transcriptase reversa) do HIV-1.....	49
Tabela 9: Detalhamento do protocolo de Nested PCR utilizado no laboratório para amplificação da região da polimerase (protease e transcriptase reversa) do HIV.	50
Tabela 10: Reagentes e quantidades necessárias para preparar o mix de uma reação.....	52
Tabela 11: <i>Primers</i> utilizados na reação de sequenciamento da região da Polimerase do HIV-1 (Protease e Transcriptase Reversa).	53
Tabela 12: Características demográficas e laboratoriais dos pacientes no momento da coleta para genotipagem da polimerase (PT + RT) do HIV-1.....	58
Tabela 13: Regressão Logística para avaliar a associação das variáveis demográficas e laboratoriais com a presença de pelo menos uma mutação de resistência para a classe dos Inibidores da Protease (IP-DRM).....	62
Tabela 14: Regressão logística para avaliar a associação das variáveis demográficas e laboratoriais com a resistência ao darunavir (DRV).	64
Tabela 15: Porcentagem, por subtipo, de mutações de resistência para a classe dos inibidores da protease (IP) no grupo de pacientes expostos a pelo menos um IP.....	65
Tabela 16: Regressão Logística para avaliar a associação das variáveis demográficas e laboratoriais com a presença da mutação I50LV na protease do HIV-1.....	68

ÍNDICE

1. Introdução.....	14
1.1 Um breve histórico da Aids – HIV.....	14
1.2 O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).....	18
1.3 Origem e diversidade do HIV.....	21
1.4 Ciclo de Replicação do HIV.....	24
1.5 Terapia Antirretroviral (TARV).....	26
1.6 Falha ao Tratamento e Resistência aos Antirretrovirais.....	31
1.7 Terapias de resgate para pacientes com falha virológica.....	35
1.8 Justificativa.....	40
2. Objetivos.....	42
2.1 Objetivo Geral.....	42
2.2 Objetivos Específicos.....	42
3. Metodologia.....	43
3.1 Comitê de Ética.....	43
3.2 População do estudo.....	43
3.3 Metodologia Laboratorial utilizada para obtenção das sequências.....	46
3.3.1 Coleta e Processamento do Material Biológico.....	46
3.3.2 Quantificação da Carga Viral e Contagem de Células TCD4 ⁺	46
3.3.3 Extração do material genético: RNA viral.....	47
3.3.4 Amplificação do RNA viral: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	48
3.3.5 Sequenciamento do produto amplificado.....	52
3.4 Análises Moleculares.....	54
3.4.1 Determinação do Subtipo Viral.....	54
3.4.2 Grau de Susceptibilidade aos Antirretrovirais (ARV) – <i>Genotypic Susceptibility Score (GSS)</i>	54
3.4.3 Mutações associadas à resistência.....	55
3.5 Análises Estatísticas.....	55
4. Resultados.....	57
5. Discussão.....	69
6. Conclusões.....	75
7. Referências Bibliográficas.....	76
8. Anexos.....	87

1. Introdução

1.1 Um breve histórico da Aids – HIV

Por volta do início da década de oitenta surgiram os primeiros relatos sobre a ocorrência de um tipo raro de câncer de pele chamado Sarcoma de Kaposi, assim como de diversas doenças oportunistas, ambos associados ao mau funcionamento do sistema imune. Além disso, observou-se uma frequência elevada e atípica destas doenças, ocorrendo principalmente entre homens jovens que faziam sexo com homens (Prusiner, 2002; Avert, 2018; A TIMELINE, 2016).

Ainda no início dos anos oitenta, quadros de pneumonia por *Pneumocystis carinii* (PCP) começaram a ser observados em pessoas que faziam uso de drogas injetáveis. Em 1982, a Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (aids), ainda não tão bem conhecida, foi relatada em populações de hemofílicos e também em haitianos, levando a comunidade científica a acreditar que essa doença tivesse se originado no Haiti (Avert, 2018; A TIMELINE, 2016).

Ainda neste mesmo ano, dois grupos de pesquisa buscavam a identificação e o isolamento do agente causador da aids. Um grupo localizava-se no Instituto Pasteur, em Paris, e era liderado por Luc Montagnier. O outro grupo, no CDC (Center for Disease Control), situado nos Estados Unidos da América, e era liderado por Robert Gallo. Foi o CDC o primeiro a usar o termo aids para se referir à doença (Avert, 2018; A TIMELINE, 2016).

Descobertas ocorridas por volta deste mesmo período também foram de fundamental importância para o isolamento do vírus causador da aids. Como exemplos, houve a descoberta da interleucina-2, um fator de crescimento fundamental para a cultura de linfócitos T utilizada para replicar o vírus *in vitro* (Morgan et al., 1976; Prusiner, 2002), e também o isolamento da enzima transcriptase reversa, presente nos retrovírus e fundamental para sua replicação (Baltimore, 1970; Temin; Mizutani, 1970).

Na época em que a doença começou a ganhar maiores proporções, o grupo coordenado por Luc Montagnier estudava os retrovírus causadores de câncer. Em

1982, focou seus estudos em encontrar o agente causador da aids, após Robert Gallo ter levantado a hipótese de que esta doença seria causada por um retrovírus. Em 1983, o grupo de Montagnier conseguiu realizar o cultivo de linfócitos T com as células provenientes de amostra de biópsia de um paciente com linfadenopatia (Montagnier, 2002).

Com isso, em janeiro deste mesmo ano, foi observada a atividade da enzima transcriptase reversa, pertencente exclusivamente aos retrovírus, confirmando assim a teoria de Robert Gallo. Então, o grupo de Montagnier realizou o isolamento deste vírus, o qual recebeu o nome de *lymphadenopathy associated virus* (LAV) (Montagnier, 2002).

Na mesma época, o grupo de Robert Gallo, que também estudava retrovírus, isolou o vírus causador da leucemia associada a células T em humanos, o *human T-lymphotropic virus* (HTLV). Em 1983, a aids foi observada em mulheres parceiras de homens que tinham a doença, sugerindo que a via de transmissão poderia ser também heterossexual. Em setembro deste mesmo ano, o CDC identificou todas as principais rotas de transmissão da aids e publicou o primeiro conjunto de precauções para os profissionais da saúde (Gallo, 2002; Prusiner, 2002; Avert, 2018; A TIMELINE, 2016).

Como o HTLV e o vírus causador da aids possuíam o mesmo modo de transmissão e ambos utilizavam os linfócitos para se replicar, Robert Gallo sugeriu que o agente causador da aids fosse da mesma família do HTLV. Com isso, o National Cancer Institute anunciou, em abril de 1984, que o vírus causador da aids se tratava de um retrovírus chamado por eles de HTLV-III (Gallo, 2002; Avert, 2018).

Apesar destas características em comum, o vírus causador da aids produzia efeitos citopáticos que acabavam reduzindo drasticamente a quantidade de células T, enquanto que o HTLV provocava a imortalidade das células infectadas. Esta diferença tornou pouco provável que a aids se tratasse de uma infecção provocada pelo HTLV. Além disso, o vírus associado à aids possuía também algumas outras características diferentes das presentes no HTLV, o que contribuiu para crer que se tratava de um outro vírus (Gallo, 2002; Montagnier, 2002; Prusiner, 2002).

Um tempo depois se comprovou que tanto as pesquisas do grupo de Luc Montagnier quanto às do grupo de Robert Gallo descreveram exatamente o mesmo vírus. Em 1984, os pesquisadores da Universidade da Califórnia, Jay Levy e colaboradores, conseguiram isolar o vírus de pessoas assintomáticas e o denominaram de retrovírus associado à aids (AIDS - *associated retrovirus*), levando as comunidades médica e científica a aceitarem a correlação deste vírus isolado com a aids (Gallo, 2002; Montagnier, 2002; Prusiner, 2002).

Em dezembro de 1985, o serviço de saúde pública dos EUA anunciou as primeiras recomendações para prevenir a transmissão vertical (de mãe para filho). Em maio de 1986, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV*) recomendou que o vírus passasse a ser chamado de vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus – HIV*). Portanto, foi nessa época que o vírus recebeu o nome pelo qual é conhecido até os dias atuais (Prusiner, 2002; Avert, 2018).

Ainda em 1986, outro tipo de HIV também foi isolado. Este segundo tipo, que recebeu o nome de vírus da imunodeficiência humana do tipo 2, ou HIV-2, se limita mais ao oeste da África e se manifesta de maneira mais amena em relação ao vírus anteriormente isolado (Prusiner, 2002).

Ainda que até o momento não haja sucesso no desenvolvimento de uma vacina preventiva à infecção pelo HIV, muitos outros progressos foram obtidos para o seu controle desde a sua descoberta. Como exemplo, tem-se a disponibilidade de testes sorológicos comerciais que permitem a detecção do vírus, o que possibilitou a redução significativa na transmissão do HIV por transfusões de sangue (Gallo & Montagnier, 2002; Avert, 2018).

Outro avanço foi a produção dos medicamentos antirretrovirais (ARV) e da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), ou seja, de drogas que impedem que o ciclo de reprodução do vírus se inicie ou se complete e, conseqüentemente, são capazes de manter a viremia dos indivíduos portadores do HIV em níveis até mesmo indetectáveis, proporcionando-se uma melhor qualidade de vida para essas pessoas (Gallo & Montagnier, 2002; Avert, 2018).

Os avanços atuais caminham no sentido da prevenção com o uso de drogas antirretrovirais pré e pós exposição de risco, chamados de PrEP (Profilaxia Pré-Exposição) e PEP (Profilaxia Pós-Exposição). Visam, também, a possibilidade de utilizar esquemas com menos ARV, o que causaria menos danos colaterais às pessoas portadoras do vírus, além de realizar pesquisas voltadas para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas a fim de obter a cura funcional do HIV (Brasil, 2018).

Apesar de tais avanços, estima-se que até o ano de 2017, cerca de 77,3 milhões (59,9 milhões – 100 milhões) de pessoas no mundo já haviam sido infectadas pelo HIV e que, deste total, 35,4 milhões (25 milhões – 49,9 milhões) teriam ido a óbito em decorrência de causas associadas à aids. Além disso, somente no ano de 2017, calcula-se que houve 1,8 milhão (1,4 milhão – 2,4 milhões) de novas infecções pelo HIV no mundo e que cerca de 9,4 milhões de pessoas não sabiam que vivem com este vírus (UNAIDS, 2018).

Somente na América Latina, até o ano de 2017, calcula-se que aproximadamente 1,8 milhão (1,5 milhão – 2,3 milhões) de pessoas estivessem vivendo com o HIV. O número de mortes por motivos associados à aids foi de 37 mil (26 mil – 51 mil) indivíduos e aproximadamente 400 mil pessoas não sabiam seu status sorológico. Os países desta região que apresentaram o maior número de pessoas vivendo com o HIV até 2017 foram o Brasil (860 mil), o México (230 mil), a Colômbia (150 mil) e a Argentina (120 mil), juntos somando mais da metade dos casos da América Latina (UNAIDS, 2018).

No Brasil, país que sozinho detém 35% do total de casos da América Latina, foram registradas cerca 860 mil pessoas vivendo com HIV no ano de 2017. Entre os adultos do sexo masculino totalizou-se 550 mil (390 mil – 730 mil), e do sexo feminino, 300 mil (220 mil – 400 mil) casos. O número de novas infecções pelo HIV foi de 48 mil (35 mil – 63 mil) indivíduos, em 2017, e a quantidade de mortes associadas à aids foi igual a 14 mil (9,4 mil – 18 mil) (UNAIDS, 2018).

Segundo o Boletim Epidemiológico divulgado em 2018 pela Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde do Brasil, entre janeiro de 2007 e junho

de 2018, foram registrados 247.795 indivíduos infectados pelo HIV no país. A região que detém o maior número de casos é o sudeste brasileiro, com 47,4% (117.415), seguida das regiões sul (20,5% - 50.890), nordeste (17% - 42.215), norte (8% - 19.781) e centro-oeste (7,1% - 17.494).

Do total estimado de aproximadamente 860 mil pessoas vivendo com HIV no Brasil em 2017, calcula-se que 63% (548) estavam em uso de terapia antirretroviral (TARV) e que 58% (503) apresentaram carga viral suprimida (contagem inferior a 1000 cópias/mL), importante parâmetro que visa a redução do número de novas infecções e da chance de desenvolvimento da aids (Brasil, 2018).

1.2 O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

O HIV é um vírus pertencente à família *Retroviridae* e ao gênero *Lentivirus*. A principal característica dos retrovírus é a expressão de uma enzima chamada transcriptase reversa, cuja função é polimerizar o DNA complementar (cDNA) de fita dupla a partir de seu genoma constituído por fita simples de RNA (ácido ribonucleico) (Coffin, 1979; Coffin, 1996).

Atualmente, são conhecidos oito gêneros diferentes de retrovírus, de acordo com sua estrutura genômica e sequência de nucleotídeos. Cada um deles pode causar diversos tipos de manifestações em diferentes espécies de animais, desde as benignas até as mais malignas. Todos os retrovírus possuem estrutura e tamanhos muito parecidos, em torno de 100 a 120 nanômetros de diâmetro (Coffin, 1979; Coffin, 1996).

A estrutura desses vírus normalmente é composta por um envelope viral formado por bicamada fosfolipídica, oriunda da membrana da célula hospedeira, e por glicoproteínas de superfície e transmembrana. As outras partes que compõem os retrovírus são o capsídeo proteico e duas fitas simples de RNA, de senso positivo, com pelo menos três genes principais: *env*, *pol* e *gag* (Coffin, 1979; Coffin, 1996).

O HIV possui forma esférica, com diâmetro de 100 a 120 nanômetros e estruturas muito semelhantes aos demais retrovírus. Em seu envelope viral, possui as glicoproteínas gp120 (glicoproteína de superfície) e gp41 (glicoproteína transmembrana), formando uma estrutura que permite ao vírus ligar-se e fundir-se às novas células hospedeiras, e assim iniciar um novo ciclo viral. Logo abaixo do envelope há a matriz proteica (p17), que protege o nucleocapsídeo e é considerada fundamental para a integridade do vírus (McCune et al., 1988).

Este capsídeo do HIV, de formato cônico, é constituído pela proteína p24 e em seu interior localizam-se as duas fitas simples de RNA, bem como as enzimas que agem na replicação viral: Transcriptase Reversa (p66), Protease (p10), RNase-H (p51) e a Integrase (p31) (Gelderblom et al., 1987; Larder et al., 2001).

A figura 1 ilustra a estrutura da partícula viral do HIV.

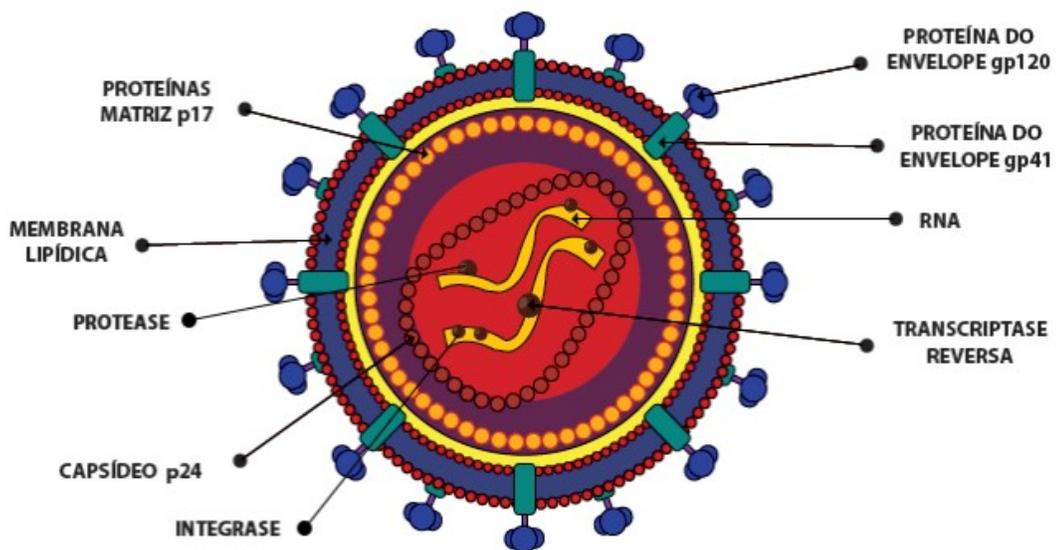


Figura 1: Esquema da partícula viral do HIV em corte transversal. É possível visualizar seu formato esférico e suas estruturas como: o envelope viral formado por membrana fosfolipídica, glicoproteína transmembrana (gp41) e glicoproteína de superfície (gp120); a matriz proteica; o capsídeo (p24); as duas fitas simples de RNA (ácido ribonucleico) e as enzimas Transcriptase Reversa (p66), Protease (p10) e a Integrase (p31). Fonte: BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual para o diagnóstico do HIV, 2014. Disponível em: <https://telelab.aims.gov.br/moodle/pluginfile.php/22163/mod_resource/content/2/HIV%20-%20Manual%20Aula%201_SEM.pdf>. Acesso em: 26 jul. 2018.

Enquanto a maior parte dos retrovírus possui um genoma composto por três genes básicos, o HIV é compreendido de nove genes diferentes, essenciais para

sua replicação viral ocorrer de maneira eficiente. Os três primeiros são conhecidos como genes estruturais (Watts et al., 2009; Flint et al., 2004; Frankel & Young, 1998), sendo eles:

Gag – Responsável pela codificação das proteínas estruturais. Por meio do precursor p55, processado por proteases virais, codifica as proteínas para a formação do capsídeo viral, produzindo subunidades para formar a matriz e o nucleocapsídeo;

Pol – Codifica as enzimas Protease (PT), que tem o papel de clivar a p55 e formar os vírions infecciosos, a Transcriptase Reversa (RT), responsável por formar o DNA complementar, e a Integrase (IN), cuja função é integrar o material genético (cDNA) do HIV ao material genético da célula do hospedeiro;

Env – A partir da proteína precursora gp160, produz as glicoproteínas do envelope viral gp120 e gp41.

Além dos genes estruturais mencionados acima, existem também dois genes regulatórios (*Tat* e *Rev*), que têm como função regular a expressão dos genes estruturais, e quatro genes acessórios (*Nef*, *Vif*, *Vpr* e o *Vpu* / *Vpx* no HIV-2), cuja função é de participar na formação e liberação das novas partículas virais. Com isso, há a capacidade de interferir diretamente no grau de infectividade do vírus (Peterlin et al., 1995; McBurney & Ross, 2008).

Como mencionado anteriormente, além do HIV-1 foi isolado outro tipo de HIV no homem, denominado HIV-2. Este segundo tipo possui estrutura genômica organizada de maneira muito semelhante à do HIV-1, com exceção de apenas um gene acessório que no HIV-1 é chamado de *Vpu* e no HIV-2 é denominado *Vpx*. Vale ressaltar que a maior parte das infecções conhecidas é ocasionada pelo HIV-1 (Korber et al., 2000; Lewinson & Jawetz, 2005).

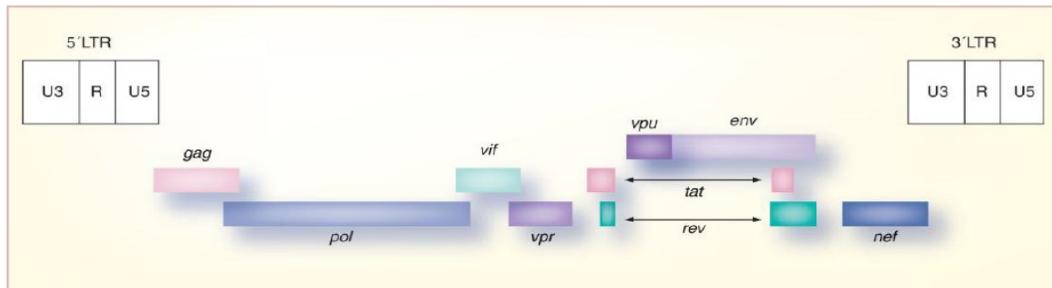


Figura 2: Esquema representativo da organização do genoma do HIV-1 (McBurney & Ross, 2008).

1.3 Origem e diversidade do HIV

Acredita-se que o HIV tenha sido introduzido na população humana por meio de diversas transmissões zoonóticas entre primatas não-humanos e humanos, ocorridas nas regiões Oeste e Central da África (Hahn et al., 2000; Chin, 2017). Portanto, de acordo com a hipótese mais aceita, o HIV provavelmente se originou a partir do vírus da imunodeficiência símia (SIV) de chimpanzés e de gorilas (Hahn et al., 2000; Sharp e Hahn, 2011; Hemelaar, 2012; Chin, 2017).

Estas independentes transmissões zoonóticas provavelmente ocorreram pelo ato de caça de primatas não-humanos para servirem como alimentos ou como animais de estimação e geraram diferentes linhagens do HIV, o qual foi classificado em dois tipos (HIV-1 e HIV-2), cada um contendo também diferentes grupos e subtipos (Korber et al., 2000; Sharp e Hahn, 2011; Hemelaar, 2012; Chin, 2017).

O HIV-1 possui quatro grupos distintos que foram identificados pela caracterização genética de vários isolados virais, com base em genomas completos, sendo eles: M (Major); O (Outlier); N (New ou Non M – Non O) e, o mais recentemente descrito, P (Putative) (Plantier et. al., 2009). De todos estes, o grupo M é provavelmente a linhagem mais antiga em humanos e a que mais se propagou pelo mundo, sendo a principal responsável pela epidemia da aids (Korber et al., 2000; Hemelaar, 2012; Chin, 2017).

As análises filogenéticas sugerem que os grupos M e N do HIV-1 tenham se originado do SIV de chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* (SIVcpz), enquanto que os grupos O e P foram provenientes do SIV de gorilas *Gorilla gorilla* (SIVgor) (Korber et al., 2000; Sharp e Hahn, 2011; Hemelaar, 2012; Chin, 2017). Por outro lado, o HIV-2, que não apresenta relação genética com o HIV-1, embora ambos possuam morfologia muito semelhante, tem sua origem em SIV de *Sooty mangabeys* – *Cercocebus atys* (SIVsmm) e possui nove linhagens distintas (A – I) (Korber et al., 200; Sharp e Hahn, 2011).

O HIV-1 possui elevada variabilidade genética e rápida evolução. Estes fatores estão associados à alta taxa de replicação viral e à elevada susceptibilidade de recombinação homóloga e de erros durante a replicação viral devido à falta de mecanismos de correção da enzima transcriptase reversa. Com isso, as inserções, deleções e substituições no genoma viral são frequentes, o que faz com que cada indivíduo possua, dentro de si, populações virais geneticamente diversificadas, porém associadas entre si, denominadas quasispécies (Hu e Hughes, 2012; Andino e Domingo, 2015; Chin, 2017).

Em função dessas condições, pelo fato de o grupo M do HIV-1 provavelmente ser a linhagem mais antiga em humanos e por estar presente em grande número dos indivíduos infectados, a diversificação viral deste grupo levou a uma complexa classificação do HIV-1. Dentro de cada subtipo, a variação genética, em nível de nucleotídeos, é de 8 a 17%, enquanto que entre os subtipos diferentes é de 17 a 35%, dependendo da região genômica e dos subtipos analisados (Chin, 2017).

Atualmente, são reconhecidos nove diferentes subtipos pertencentes ao grupo M do HIV-1 (A-D, F-H, J e K), além dos subsubtipos (A1-A4 e A6; F1-F2), das variadas formas recombinantes circulantes (CRFs) e das formas únicas recombinantes (URFs) (Janssens et al., 1994; Korber et al., 2000, Chin, 2017). O papel dos subtipos do HIV nas diferentes dimensões da epidemia de aids tem intrigado muitos pesquisadores. Desde que essa expressão peculiar da diversidade do vírus foi descrita pela primeira vez, tem sido monitorada pela rede de isolamento e caracterização do HIV-1 da OMS (Hemelaar, 2012).

Estudos moleculares epidemiológicos mostram que atualmente a infecção pelo subtipo C é predominante no mundo, representando cerca de 46,6% das infecções pelo HIV-1. Linhagens de subtipo B estão em segundo lugar, em 12,1% das infecções mundiais pelo HIV-1, seguidas pelos subtipos A (10,3%), CRF02_AG (7,7%), CRF01_AE (5,3%) e subtipo G (4,6%). Os subtipos F, H, J, K e L possuem disseminação mundial limitada. Já as formas recombinantes, atualmente representam 16,7% das infecções pelo HIV-1 no mundo, tendendo a aumentar sua representatividade com o passar do tempo (Hemelaar, 2012).

Embora as infecções pelo subtipo B representem somente 12,1% do panorama mundial, este subtipo é o mais disperso geograficamente. Em países desenvolvidos, como na Europa, Austrália e Américas, a presença do subtipo B é majoritária entre os casos de infecção pelo HIV-1, o que o leva a ser o subtipo mais estudado (Hemelaar, 2012). No Brasil, assim como nos demais países da América Latina, existe o predomínio do subtipo B, seguido por formas recombinantes BF e pelo subtipo F. Porém, o subtipo C, responsável pela maioria das infecções em todo o mundo, tem entrado lentamente no núcleo original da epidemia brasileira, o qual é predominantemente composto por linhagens do subtipo B (Hemelaar, 2012).

O aumento de infecções causadas por variantes virais do subtipo C e recombinantes BC tem sido observado não somente no Brasil, mas também em outros países da América Latina como a Argentina e o Uruguai (Dilernia et al., 2007). O subtipo F, segundo mais encontrado no estado de São Paulo, Brasil, embora raro no mundo, está presente em grande parte da América do Sul, onde recombinantes BF também são comumente encontrados (Hemelaar, 2012).

Na Europa, com exceção da Romênia, assim como na maior parte do mundo, o subtipo F também é raro. Porém, a rápida expansão deste subtipo entre homens que fazem sexo com homens (HSH) na Galícia gera a preocupação quanto ao fato de que alterações epidemiológicas moleculares podem ser rápidas e alterar o panorama atual (Thomson et al., 2012; Delgado et al., 2015).

No estado de São Paulo, assim como na maior parte do Brasil, há o predomínio de infecções causadas pelo subtipo B. Estas são seguidas por infecções causadas pelo subtipo F (cerca de 10%) e pelos recombinantes BF. Atualmente, é observado um aumento na representatividade do subtipo C nesta região (Brigido, 2011), o qual tem sido o segundo subtipo mais encontrado entre indivíduos recém infectados e virgens de tratamento deste estado (Coelho et al., 2018).

A introdução de variantes virais do subtipo C no estado de São Paulo é proveniente de uma área endêmica deste subtipo localizada no sul do Brasil, a qual é distinta de todas as outras áreas das Américas. Em decorrência do intenso intercâmbio de pessoas, inerente da economia de mercado atual, observa-se em vários locais a introdução contínua de outras variantes, o que contribui para a crescente diversidade do HIV (Hemelaar, 2018).

A elevada diversidade genética deste vírus pode ser considerada como um dos principais fatores que podem afetar a resposta do indivíduo que vive com o HIV à terapia antirretroviral, ao desenvolvimento de mutações associadas à resistência do vírus aos medicamentos antirretrovirais, à progressão para o quadro de aids e também ao desenvolvimento de vacinas eficazes contra o HIV. Por esta razão, os estudos que avaliam a diversidade viral são primordiais.

1.4 Ciclo de Replicação do HIV

A replicação do vírus começa com a sua entrada em uma célula hospedeira. Para isso, ocorre uma interação entre as glicoproteínas presentes no envelope viral (gp120 e gp41) e os receptores de membrana da célula que será infectada (CD4 e um correceptor CCR5 ou CXCR4). Portanto, durante a infecção, os alvos do HIV são células que expressam moléculas CD4 e um dos receptores de quimiocinas citados anteriormente, como células linfóides, macrófagos, células da glia, monócitos e células dendríticas (Moore & Doms, 2003; Abbas & Lichtman, 2005).

O favorecimento de infecções por agentes oportunistas durante a infecção pelo HIV se dá principalmente pelo fato de os linfócitos TCD4⁺ serem o alvo central do vírus para sua replicação. Com a replicação e liberação de novas partículas virais, que levam uma parte da membrana celular consigo a cada brotamento, grande parte dos linfócitos acabam sendo destruídos e a consequência disso é a redução ou a perda da resposta imune mediada por essas células (Lewinson & Jawetz, 2005).

Inicialmente, a gp120 do vírus se liga a um receptor TCD4⁺ específico presente na superfície da célula alvo, o que provoca uma mudança na conformação desta glicoproteína, e permite uma nova interação da gp120, agora com o correceptor de quimiocina (CCR5 ou CXCR4). Esta etapa inicial permite agora que a gp41 exponha uma região hidrofóbica, denominada peptídeo de fusão, que será inserida na membrana celular e, com isso, possibilitará a ocorrência de fusão da membrana do vírus com a membrana da célula alvo (Moore & Doms, 2003; Abbas & Lichtman, 2005).

Os vírus que utilizam o correceptor CCR5 para entrar na célula, ou seja, que têm tropismo pelo CCR5, são chamados de R5, e os vírus com tropismo pelo CXCR4 são chamados de vírus X4 (Poveda et al., 2010).

Depois do processo de fusão das membranas, as enzimas presentes no nucleocapsídeo são ativadas e iniciam o processo de replicação do vírus. Neste momento, a enzima transcriptase reversa transcreve o RNA viral em cDNA linear de dupla fita e a fita molde de RNA é degradada pela enzima RNase-H. Então, a integrase, como o próprio nome sugere, faz a integração do cDNA ao genoma da célula humana, o qual passa a ser chamado de DNA proviral (Varmus & Swanstrom, 1985; Flint et al., 2004; Abbas & Lichtman, 2005).

Uma vez que o DNA proviral é inserido no genoma da célula hospedeira, ocorre a produção do RNA genômico e das proteínas virais. Este processo é realizado com a utilização da maquinaria da célula hospedeira e por meio deste DNA proviral que está integrado ao genoma celular. Entre as proteínas virais produzidas são geradas as poliproteínas que sofrem a ação da protease, que as cliva em proteínas menores. Este processo ocorre a partir do momento em que o vírion imaturo brota da

membrana celular e é recoberto pela bicamada fosfolipídica, resultando em um vírus maduro e infeccioso (Göttlinger et al., 2001; Campbell & Hope, 2008), como pode ser visualizado na figura 3:

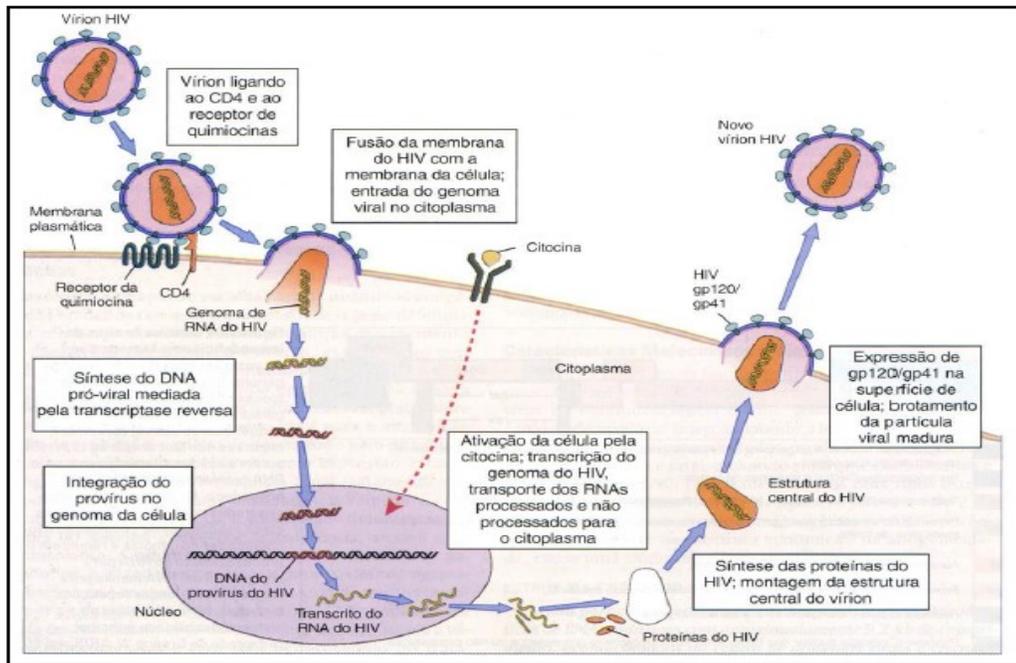


Figura 3: Esquema representando o ciclo de replicação do HIV-1 (Abbas & Lichtamn, 2005).

1.5 Terapia Antirretroviral (TARV)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2018), em inglês World Health Organization (WHO), a terapia antirretroviral (TARV) consiste em uma combinação de drogas antirretrovirais (ARV) que objetiva maximizar a supressão viral e, com isso, parar a progressão do vírus. Além disso, a terapia antirretroviral, por manter a viremia dos indivíduos infectados em níveis muito baixos, quando bem adotada, também contribui como uma barreira na transmissão do vírus, prevenindo novas infecções.

Outra contribuição significativa da TARV, principalmente quando a infecção é diagnosticada em seu início e a TARV é adotada também neste período, está na

redução dos níveis de mortalidade das pessoas infectadas e na redução da propensão de estas pessoas evoluírem para o quadro de aids, no qual apresentariam manifestação de doenças oportunistas associadas à queda do sistema imune (WHO, 2018).

Inicialmente, a TARV era vista como um meio de melhorar a qualidade e a expectativa de vida das pessoas que vivem com o HIV, impedindo a replicação viral e suprimindo a carga viral plasmática dessas pessoas (Brasil, 2013). Atualmente, além destes benefícios, acredita-se também que a TARV, em combinação com o diagnóstico precoce da infecção e com o início imediato da terapia após o diagnóstico, pode controlar ou até mesmo erradicar a epidemia de HIV até o ano de 2030 (UNAIDS, 2015).

De acordo com a UNAIDS (2015), trata-se de uma meta arrojada, mas que pode contribuir para o fim da epidemia em um tempo relativamente curto. Refere-se ao que ficou conhecido como meta 90 – 90 – 90, ou seja, até o ano de 2020 pretende-se que 90% das pessoas que vivem com o vírus saibam que o possuem, que 90% dessas pessoas recebam a terapia antirretroviral ininterruptamente e que 90% de todas as pessoas em TARV tenham viremia suprimida, como melhor ilustrado na figura 4:

A META PARA O TRATAMENTO



Figura 4: Ilustração da meta a ser atingida em 2020 para o diagnóstico e tratamento de pessoas que vivem com o HIV. Fonte: UNAIDS. 90-90-90 Uma meta ambiciosa de tratamento para contribuir para o fim da epidemia de AIDS. 2015. Disponível em: <https://unaid.org.br/wp-content/uploads/2015/11/2015_11_20_UNAIDS_TRATAMENTO_META_PT_v4_GB.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2018

Em 1996, o Brasil foi o primeiro país em desenvolvimento a oferecer gratuitamente a TARV, com a publicação da lei 9.313. De acordo com o Ministério da Saúde (2008), busca-se garantir o acesso ao tratamento para todas as pessoas que vivem com o HIV e que possuam as indicações para receber a TARV, conforme as recomendações vigentes no país. Deste modo, os casos de aids, de doenças oportunistas e de óbitos têm apresentado redução ao longo dos anos.

O início da TARV após o diagnóstico da infecção permanece muito discutido, e em diversas regiões do mundo, tem-se utilizado a contagem de células TCD4⁺ como principal parâmetro laboratorial para o início da TARV em pacientes assintomáticos, visto que este é um indicador do risco de progressão para o quadro de aids (Santos et al., 2008).

De acordo com a International Antiviral Society (IAS-USA), o início da terapia deve ser feito quando o paciente atinge contagem de células TCD4⁺ ≤ 500 células/mm³. Para a Organização Mundial da Saúde (WHO), a terapia deve ser iniciada quando a contagem de células TCD4⁺ for ≤ 350 células/mm³ (WHO, 2010; Thompson et al., 2012).

No Brasil, o Ministério da Saúde recomendava, pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) de 2013, que pacientes sintomáticos deveriam iniciar a TARV imediatamente, independentemente da contagem de células TCD4⁺. Já os pacientes assintomáticos, sempre deveriam iniciar a TARV quando apresentassem contagem de células TCD4⁺ inferior a 500 células/mm³, ou mesmo com contagens superiores em situações especiais como na coinfeção por hepatite B ou C, ou em gestantes.

Contudo, em 2018, foi lançado um novo PCDT pelo Ministério da Saúde, o qual recomenda que seja adotado o início imediato da TARV para qualquer pessoa que viva com o HIV, independentemente do estágio clínico ou imunológico, ou seja, de o paciente apresentar ou não sintomas, e da contagem de células TCD4⁺.

O primeiro medicamento utilizado para tratar pessoas portadoras do HIV foi um fármaco que no final da década de 80 estava sendo utilizado em tratamentos contra o câncer, chamado Zidovudina (AZT). No início não se sabia muito bem a respeito da dose mais adequada a ser administrada nos portadores de HIV. Doses muito

elevadas, de 1.500 miligramas por dia, eram dadas a essas pessoas, o que reduzia a mortalidade e também os quadros de doenças oportunistas, mas frequentemente causava efeitos colaterais (Fischl et al., 1987; Barros & Silva, 2017).

Atualmente, existem vários compostos diferentes que podem ser utilizados como tratamento para as pessoas que vivem com o HIV, cada um interferindo em diferentes etapas da replicação viral, sendo até mesmo possível a sua utilização como profilaxia pré ou pós exposição a um evento de risco (PrEP e PEP) (Brasil, 2018).

Os antirretrovirais são classificados basicamente em seis classes, de acordo com as características de ação do medicamento, sendo elas: Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (ITRN); Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos de Nucleosídeos (ITRNN); Inibidores da Protease (IP); Inibidores de Fusão; Antagonistas de CCR5 e os Inibidores da Integrase (INI), sendo as três últimas classes também conhecidas como medicamentos de Novas Classes (NC).

Os medicamentos da classe ITRN têm sua atuação na enzima Transcriptase Reversa (TR), pois em função de sua similaridade aos nucleosídeos naturais, possuem a capacidade de se incorporar na cadeia de DNA que é sintetizada por esta enzima do vírus, tornando-a defeituosa e impedindo que a replicação viral seja bem sucedida. Por sua vez, os ITRNN agem na mesma enzima, porém de outra maneira. Diferentemente dos anteriores, esses medicamentos atuam diretamente na enzima TR, bloqueando a sua ação ao se ligarem diretamente no sítio ativo da enzima (Levy, 2010). São eles (Tabela 1):

Tabela 1: Siglas e nomes genéricos dos medicamentos das classes ITRN e ITRNN

ITRN		ITRNN	
AZT	Zidovudina	EFV	Efavirenz
DDI	Didanosina	NVP	Nevirapina
3TC	Lamivudina	ETR	Etravirina
D4T	Estavudina	DLV	Delavirdina
TDF	Tenofovir	RIL	Rilpivirina
ABC	Abacavir		
FTC	Emtricitabina		

Os medicamentos da classe dos IP atuam na enzima Protease viral, assemelhando-se a estrutura dos substratos naturais da Protease e inibindo a atividade catalítica da enzima, portanto, interferem no estágio final da replicação do vírus (Tabela 2) (Levy, 2010; Clavel & Hance, 2004).

Tabela 2: Siglas e nomes genéricos dos medicamentos da classe IP

IP	
IDV	Indinavir
NFV	Nelfinavir
LPV	Lopinavir
SQV	Saquinavir
FPV	Fosamprenavir
ATV	Atazanavir
DRV	Darunavir
TPV	Tipranavir
AMP	Amprenavir
RTV	Ritonavir

Os Inibidores de Fusão atuam na gp41, impedindo que haja o processo de fusão das membranas do vírus e da célula hospedeira (Levy, 2010; Melby et al., 2006). A classe de Antagonistas do CCR5 atua impossibilitando a ligação do vírus aos correceptores da célula hospedeira chamados de CCR5, bloqueando estes correceptores celulares (Levy, 2010).

Por fim, os Inibidores da Integrase impedem que ocorra a inserção da fita de cDNA transcrita pelo vírus no genoma da célula hospedeira e também são conhecidos como inibidores de transferência de fita (Levy, 2010; Espeseth et al., 2000). Os medicamentos de Novas Classes são apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Siglas e nomes genéricos dos medicamentos de Nova Classe

NC					
Inibidor de Fusão		Inibidores da Integrase		Inibidor de Entrada	
T-20	Enfuvirtida	RAL	Raltegravir	MVQ	Maraviroque
		EVG	Elvitegravir		
		DTG	Dolutegravir		

1.6 Falha ao Tratamento e Resistência aos Antirretrovirais

Como mencionado anteriormente, a TARV visa manter a viremia dos pacientes que vivem com o HIV em níveis muito baixos ou até mesmo indetectáveis. De acordo com o Ministério da Saúde, 2018, os esquemas atuais de antirretrovirais possibilitam que pelo menos 80% dessas pessoas apresentem carga viral inferior a 50 cópias/mL depois de um ano do início do tratamento, e a maioria destas pessoas permanece com a supressão viral nos anos seguintes.

Para esses 20% que não apresentam a não detecção da viremia no primeiro ano de tratamento, ou para aqueles que atingem o nível de viremia indetectável, mas que voltam a apresentar viremia depois de determinado tempo, novos medicamentos têm sido estudados, assim como novas estratégias para efetuar uma terapia de resgate. Ainda de acordo com o Ministério da Saúde, 2018, reconhecer precocemente a falha virológica e optar por um esquema de resgate adequado são medidas fundamentais para evitar consequências graves, como: maior progressão da doença e acúmulo de mutações de resistência aos ARV, o que gera perda de opções para futuros esquemas terapêuticos.

A falha virológica é o principal parâmetro para caracterizar a falha da terapia antirretroviral e é definida pela presença de níveis detectáveis de viremia mesmo após seis meses do início ou da troca de TARV. São também classificados como casos de falha virológica aqueles em que o paciente se mantém com viremia indetectável por muitos anos no decorrer de seu tratamento e em determinado momento ocorre o que é conhecido como rebote viral, ou seja, a viremia destes indivíduos volta a apresentar níveis detectáveis (Brasil, 2018).

As principais causas para esse quadro são: a má adesão do paciente ao esquema, a transmissão de resistência viral, a utilização de esquemas inadequados (subótimos) por diferentes motivos e a resistência viral adquirida, que ocorre principalmente em decorrência da má adesão. Quando o paciente não se medica corretamente, os níveis baixos de medicamentos no sangue não são suficientes para

impedir completamente a replicação do vírus, o que gera um processo de pressão seletiva e de promoção de subpopulações resistentes aos ARV (Brasil, 2018).

Como as mutações de resistência do vírus aos ARV são vistas na grande maioria dos casos em que há falha virológica, a recomendação do Ministério da Saúde é que as pessoas com esse quadro realizem o teste de genotipagem do HIV para efetuar a pesquisa de resistência viral e auxiliar na composição de um novo esquema, chamado esquema de resgate, que possua maiores chances de levar à supressão viral (Brasil, 2018).

Cabe ressaltar que a presença de carga viral persistente, mesmo que seja em níveis baixos, pode acarretar no acúmulo de resistência e no favorecimento da perda de ARVs, pela existência de resistência cruzada nas classes dos ARV em uso. Estima-se que aproximadamente 60% dos pacientes que apresentam CV com supressão parcial após 18 meses de tratamento, acabam desenvolvendo novas mutações de resistência, levando-se à perda de uma opção de medicamento após um ano, em aproximadamente um terço dos casos (Brasil, 2018).

As mutações de resistência do vírus aos antirretrovirais se originam basicamente por dois modos principais. O primeiro deles é causado pela alta taxa de replicação do vírus conjuntamente com a falta de mecanismos que proporcionem redução da taxa de erros da enzima transcriptase reversa no processo de transcrição do RNA viral. Estes fatores podem modificar a composição genética das novas partículas virais formadas a partir desse processo. O segundo modo tem como principal fator a pressão seletiva exercida pelos medicamentos antirretrovirais, principalmente nos pacientes em que existe a má adesão ao tratamento. (Van Vaerenbergh, K. 2001).

Em geral, as mutações não são favoráveis para o vírus, pois podem gerar alterações nas proteínas virais essenciais para a sua replicação ou produzir códons de parada no início de regiões codificadoras de proteínas, reduzindo o *fitness* viral ou até mesmo impedindo sua replicação. Por esta razão, as variantes com mutações que sejam muito prejudiciais ao vírus tendem a não se manter por muito tempo nas condições normais (Martinez-Picado, 2008; Sahu, 2015).

Entretanto, no cenário de pressão seletiva causada pelos ARV, o surgimento de variantes com mutações, que as tornam melhor adaptadas a esta nova situação, pode levar à mudança da população selvagem original. Com isso, durante o tratamento, a replicação viral residual e o surgimento de variantes com mutações que possibilitam sua replicação mesmo na presença dos ARV não são raros (Martinez-Picado, 2008; Sahu, 2015).

Existem duas classificações nas quais as mutações virais podem se enquadrar: mutações polimórficas e mutações não polimórficas. De acordo com Thompson e Thompson, 2016, a presença de alelos diferentes em indivíduos considerados normais é comum, pois a variação genética é por si só muito frequente. Ainda de acordo com estes autores, as mutações são alterações na sequência de nucleotídeos que tornam as variantes que as possuem diferentes das variantes selvagens (sem mutações).

Os polimorfismos são consequência da diversidade do HIV. São considerados como mutações que ocorrem na ausência de pressão seletiva pelos ARV, presentes em níveis acima de 1% na população viral e que normalmente, sozinhas, exercem baixo ou nenhum efeito sobre a redução da susceptibilidade do vírus aos ARV. De acordo Bennet et al., 2009, os polimorfismos não devem ser incluídos na vigilância de resistência aos ARV, pois podem levar a estimativas falsamente elevadas sobre as taxas de resistência transmitida.

As mutações não polimórficas, também segundo a classificação dos autores Bennet et al., 2009, estão presentes em uma frequência inferior ou igual a 0,5% em um total de 1000 sequências avaliadas, pertencentes a indivíduos que não fazem uso de antirretrovirais. Estas mutações estão diretamente associadas à redução da susceptibilidade do vírus aos medicamentos disponíveis.

Dois tipos de resistência aos ITRN são conhecidos, sendo o primeiro mecanismo associado à remoção do análogo da cadeia terminada de DNA e o segundo com a interferência na incorporação do medicamento (Clavel & Hance, 2004).

Os ITRNN, como já dito anteriormente, se ligam ao sítio ativo da Transcriptase Reversa e com isso impedem sua ação. Os medicamentos existentes com este

mecanismo de ação possuem praticamente o mesmo modo de ligação na enzima. É necessária apenas uma mutação no códon de produção dessa enzima para que ocorra a redução da susceptibilidade viral a estes medicamentos, bem como a resistência cruzada entre eles. Os medicamentos de segunda geração pertencentes a essa classe, que possuem maior barreira genética, foram aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) recentemente (Bachelier et al., 2000; Delaugerre et al., 2001; Azijn et al., 2010).

Quanto aos inibidores da protease, existem mutações que são capazes de produzir mudanças fenotípicas no sítio ativo da enzima, impedindo ou reduzindo a capacidade de ligação dos medicamentos à ela, sendo estas mutações chamadas de primárias ou principais. Um segundo tipo de mutações, conhecido como mutações secundárias ou menores, não causam efeitos na conformação da enzima. Mas os dois tipos de mutação em conjunto favorecem melhora na replicação viral (Cahn et al., 2006; Tremblay, 2008; Llibre et al., 2008).

Para os inibidores de fusão, uma única mutação no genoma do vírus já é suficiente para que haja perda de susceptibilidade e existem sete códons que podem levar a uma mutação nesta classe. A classe dos antagonistas do CCR5 também apresenta dificuldades e restrições para utilização, pois somente um medicamento está disponível atualmente. Ele funciona apenas quando o vírus é R5, sendo necessária a realização do teste de tropismo fenotípico ou genotípico para saber se existem variantes CCR5 ou não (McArthur & Novak 2008).

As mutações de resistência aos Inibidores da Protease não são muito frequentes e existem poucos casos descritos de resistência primária à esta classe, o que permite que por enquanto não seja necessária a realização de exames de genotipagem prévia ao início de utilização destes medicamentos (Ceccherini-Silberstein et al., 2010).

1.7 Terapias de resgate para pacientes com falha virológica

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) de 2013, recomendava que o esquema de primeira linha, ou seja, primeiro esquema adotado pelo paciente após seu diagnóstico, deveria sempre incluir três medicamentos, sendo dois antirretrovirais (ARVs) da classe dos ITRN em combinação com um ARV da classe dos ITRNN.

Ainda de acordo com o PCDT de 2013, o esquema de regra deveria ser o seguinte: 3TC + TDF + EFV. Tal escolha foi feita com base no baixo perfil de toxicidade desses medicamentos, bem como na sua posologia, que o torna de mais fácil adesão, e também nos perfis de resistência conhecidos para estes medicamentos. Como esquema de segunda linha, o PCDT de 2013 recomendava que fossem utilizados dois ITRN e um IP, de preferência: 3TC + TDF + LPV/r.

Nos casos em que houvesse falha virológica, caracterizada por carga viral plasmática detectável após seis meses do início do esquema terapêutico ou pela detecção de viremia em indivíduos que permaneciam com níveis indetectáveis ao longo do tratamento, recomendava-se adotar esquema com pelo menos um ARV ativo. Neste caso, poderiam ser utilizados ARVs como DRV/r; TPV/r; RAL; ETR; MVQ; T-20 para compor a terapia de resgate.

Atualmente, o esquema recomendado pelo PCDT de 2018 para o primeiro tratamento inclui um ARV da classe dos Inibidores da Integrase, o DTG, exceto apenas para os casos em que haja impossibilidade de utilização deste medicamento. A tabela 4 mostra melhor a indicação de início de TARV para cada caso.

Tabela 4: Esquemas de TARV inicial preferencial para adultos. Fonte: Brasil, 2018.

SITUAÇÃO	TERAPIA ANTIRRETROVIRAL	DOSE DIÁRIA	OBSERVAÇÃO
Adultos em início de tratamento ^(a)	TDF ^(b) /3TC + DTG ^(c)	(300mg/300mg) "2 x 1"+ 50mg 1x/dia	
Coinfecção TB-HIV ^(d) sem critérios de gravidade (conforme critérios elencados abaixo)	TDF ^(b) /3TC/EFV	(300mg/300mg/600mg) – DFC 1x/dia	Concluído o tratamento completo para TB, poderá ser feita a mudança (switch) do EFV para DTG.
Coinfecção TB-HIV com um ou mais dos critérios de gravidade abaixo ^(d) : LT-CD4+ <100 céls/mm ³ Presença de outra infecção oportunista Necessidade de internação hospitalar/ doença grave Tuberculose disseminada	TDF ^(b) /3TC + RAL	(300mg/300mg) "2 x 1" 1x/dia + 400mg 12/12h	Concluído o tratamento completo de TB, deverá ser feita a mudança (switch) do RAL para DTG em até 3 meses

De acordo com o PCDT de 2018, quando o paciente está em falha virológica, é recomendada a adição de um IP ativo ao esquema de antirretrovirais. Além disso, também é indicada a avaliação da necessidade de inclusão de novos medicamentos e/ou de medicamentos de novas classes no esquema de resgate. Esta avaliação é feita com base nos níveis de CV e de linfócitos TCD4⁺ e, também, nos perfis de resistência à protease viral, visando aumentar as chances de não detecção da viremia do paciente. Por esta razão, a avaliação da protease viral quando há falha virológica, se faz extremamente necessária (Brasil 2018).

A tabela 5 mostra as opções de esquemas de antirretrovirais a serem adotados no caso de falha virológica inicial, ou seja, de falha ao primeiro tratamento.

Tabela 5: Esquemas de ARV para resgate da falha inicial em adultos. Fonte: Brasil, 2018.

FALHA INICIAL	OPÇÕES DE ESQUEMA DE RESGATE	COMENTÁRIOS
2 ITRN + ITRNN	2 ITRN + IP/r	Os esquemas LPV/r + RAL e 2 ITRN + LPV/r apresentam eficácia alta e duradoura, independentemente do nível de resistência aos ITRN. É provável que esquemas semelhantes contendo DRV/r e DTG tenham a mesma eficácia
	IP/r + INI	
	1 ou 2 ITRN + IP/r + INI	Esquemas incluindo pelo menos 2 medicamentos ativos têm sido recomendados para terapia de resgate em geral. Podem ser preferidos nos casos de resistência ampla aos ITRN, LT-CD4+ baixo e CV-HIV alta
2 ITRN + IP/r	2 ITRN + IP/r	Em geral, a falha dos esquemas iniciais baseados em IP/r não está associada a acúmulo de mutações na protease ou resistência aos IP/r. Na ausência de mutações principais na protease, a correção da adesão, a substituição por IP/r mais bem tolerado e a revisão de interações medicamentosas são medidas suficientes para adequar o esquema e atingir a supressão viral. Deve-se considerar que a adição de novos medicamentos pode tornar o esquema mais complexo e desfavorecer a adesão
	1-2 ITRN + IP/r + INI	Esquemas contendo pelo menos 2 medicamentos ativos e uma nova classe de ARV podem ser preferidos nos casos de resistência ampla a ITRN, LT-CD4+ baixo e CV-HIV alta, sendo recomendados em caso de presença de mutações principais na protease, com comprometimento da classe
2 ITRN + INI	2 ITRN + IP/r	Não há dados de estudos clínicos sobre o resgate de esquema inicial baseado em INI; porém, a eficácia de 2 ITRN + IP/r em pacientes virgens de IP foi demonstrada em estudos de resgate de esquemas baseados em ITRNN
	1 ou 2 ITRN + IP/r + droga ativa de outra classe	Esquemas incluindo pelo menos 2 medicamentos ativos têm sido recomendados para terapia de resgate. Podem ser preferidos nos casos de resistência ampla, LT-CD4+ baixo e CV-HIV alta. DTG na dose de 50mg 2x/dia pode ser ativo contra vírus resistente a RAL; o uso de DTG nesses casos deve ser baseado nos resultados do teste de genotipagem, inclusive da integrase

Na tabela 6 estão apresentados os medicamentos indicados pelo PCDT de 2018 para compor os esquemas citados na tabela 5.

Tabela 6: Medicamentos de escolha para compor o esquema de resgate da falha inicial. Fonte: Brasil, 2018

CLASSE	MEDICAMENTOS	COMENTÁRIOS
Inibidores da protease	ATV/r	Primeira opção na classe dos IP. Dose única diária de 300mg associado a 100mg de ritonavir. Posologia única diária favorece a adesão.
	DRV/r	Apresentação de 600mg, associado a 100mg de ritonavir em duas doses diárias. Alternativa para contraindicação, intolerância ou toxicidade comprovada ao ATV.
	LPV/r	Comprimidos de 200mg de LPV coformulado com 50mg de ritonavir. Dose de 400mg/100mg duas vezes ao dia.
Inibidores da integrase	DTG	Dose única diária de 50mg, na ausência de mutações ou falha prévia a INI. Primeira opção na classe, devido à posologia favorável e barreira genética. Seu uso em MVHIV com possibilidade de engravidar deve ser associado a método contraceptivo eficaz, preferencialmente os que não dependam da adesão (DIU ou implantes anticoncepcionais).
	RAL	Dose de 400mg duas vezes ao dia. Restrito a situações nas quais DTG não é recomendado, como gestantes, uso concomitante de rifampicina ou anticonvulsivantes sem possibilidade de troca (fenobarbital, fenitoina, oxacarbazepina, carbamazepina).

Além da falha inicial, também podem existir casos em que o vírus tenha desenvolvido múltiplas falhas aos antirretrovirais, após exposição a diversos esquemas. Nestas situações, existe a necessidade de incorporar ao esquema os medicamentos que, em sua maioria, são de uso restrito apenas para os quadros mais complexos como estes. Na tabela 7 estão apresentados os medicamentos que devem ser utilizados na terapia de resgate em casos de múltiplas falhas.

Tabela 7: Medicamentos para composição da TARV de resgate para quadros de múltiplas falhas aos ARV. Fonte: Brasil, 2018.

CLASSE/ MEDICAMENTO	INDICAÇÃO	COMENTÁRIOS
Inibidores de protease		
DRV/r	IP/r preferencial quando há mutações na protease, devido à alta barreira genética e boa tolerância.	Na presença de mutações de resistência para DRV/r, deve ser usado sempre em duas doses diárias. Não pode ser coadministrado com rifampicina.
TPV/r	Alternativa ao DRV/r. Reservado para casos de resistência ao DRV/r e susceptibilidade ao TPV/r.	Há necessidade de potencialização com dose maior de RTV (200mg 2x/dia). Contraindicado em combinação com ETR e, em caso de mutações na integrase, com DTG. Não pode ser coadministrado com rifampicina.
Inibidores da Integrase		
DTG	INI preferencial, exceto para gestantes ou pacientes em uso de rifampicina.	Nos casos de resistência comprovada ao RAL ou coadministração de EFV ou TPV, deve ser usado em dose dobrada (50mg 2x/dia). Se houver resistência ao RAL, não pode ser combinado com EFV ou TPV. Há poucos dados sobre a coadministração com rifampicina, particularmente na situação de resistência na integrase. Seu uso em MVHIV com possibilidade de engravidar deve ser associado a método contraceptivo eficaz, preferencialmente os que não dependam da adesão (DIU ou implantes anticoncepcionais).
RAL	Restrito a casos de susceptibilidade ao RAL associada a situações em que o DTG não é recomendado.	Pode ser coadministrado com rifampicina sem ajuste de dose.
Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos		
ETR	Recomendado para compor esquema de resgate quando o IP/r e o INI são considerados insuficientes para garantir a supressão viral.	Indicado em caso de sensibilidade plena à ETR e resistência ou contraindicação aos ITRNN de primeira geração (EFV e NVP). Em situações de falta de opções terapêuticas, pode compor o esquema de resgate, mesmo se a atividade prevista pela genotipagem for intermediária. Ressalta-se que o teste de genotipagem pode subestimar a resistência à ETR em casos de falha prévia a EFV e, principalmente, a NVP. Não pode ser coadministrado com rifampicina.
Inibidores de entrada		
Antagonista de CCR5 – maraviroque (MVC)	Recomendado para compor esquema de resgate quando DRV/r, DTG e ETR são considerados insuficientes para garantir a supressão viral.	Somente indicado se houver teste de genotropismo recente (6 meses) evidenciando presença exclusiva de vírus R5. Pode ser coadministrado com rifampicina; porém, há necessidade de ajuste de dose do MVC, conforme a composição restante do esquema ARV (ver Anexo A).
Inibidor de fusão – ENF/T20	Medicamento injetável, restrito a pacientes portadores de vírus multirresistentes sem outras opções terapêuticas para compor o esquema ARV.	

Considerando-se que a presença de mutações de resistência é algo prejudicial para as pessoas que vivem com HIV, o acompanhamento destas mutações se torna muito importante. Isso decorre do fato de as mutações fazerem com que os medicamentos percam parcial ou totalmente a sua eficácia, levando à consequente replicação viral, que favorece o desenvolvimento do quadro de aids.

Esta avaliação também é de grande relevância em pacientes com falha virológica para verificar mutações específicas às drogas em uso, que levam à necessidade da incorporação de novos medicamentos que tornem o esquema mais efetivo. Por exemplo, os medicamentos de novas classes, principalmente nos casos de múltiplas falhas, que são utilizados quando as opções de ARV já se encontram bastante limitadas pela presença de diferentes mutações de resistência.

1.8 Justificativa

Os diferentes subtipos do HIV-1 têm, por definição, diferente composição de nucleotídeos, o que pode potencialmente impactar de maneira desigual no surgimento e na evolução das mutações de resistência em cada subtipo (Rhee et al., 2006). No Brasil, embora em alguns casos a genotipagem pré-tratamento seja realizada para a escolha da terapia antirretroviral, em geral a conduta de tratamento é regida pela presença ou ausência de mutações de resistência, não sendo modificada em decorrência do subtipo viral.

O subtipo C do HIV-1 é responsável por aproximadamente metade da epidemia mundial e os dados sobre a resposta deste subtipo ao tratamento não são conclusivos (Touloumi et al., 2013; Kantor et al., 2015; Häggblom et al., 2016). Informações sobre a resposta do subtipo F aos ARV são ainda mais limitadas, porém, alguns trabalhos sugerem que este subtipo pode mostrar taxas reduzidas de resposta à terapia antirretroviral em comparação com pacientes infectados por variantes do subtipo B (Pernas et al., 2014).

Avaliações da expressão diferencial de mutações de resistência aos antirretrovirais entre os subtipos têm sido realizadas internacionalmente (Rhee et al., 2006). Entretanto, a prevalência de resistência contemporânea não é muito bem estabelecida, visto que poucos estudos de observância têm sido conduzidos recentemente desde a introdução dos inibidores da protease mais atuais (Ortiz et al., 2008; Molina et al., 2010). Portanto, uma avaliação atual do impacto nos tratamentos, considerando-se a eventual associação dos subtipos na evolução da resistência, se faz necessária.

O estado de São Paulo, com a co-circulação dos três subtipos principais das Américas (B, F e C), é um cenário interessante para comparar o efeito do aspecto da diversidade do HIV-1 na evolução da resistência aos antirretrovirais. É também significativo para avaliar se existe impacto da variedade dos subtipos dentro de uma mesma população, que possui acesso gratuito aos serviços de saúde, e, não menos importante, a uma mesma sequência de tratamentos.

Quanto à escolha da terapia de resgate para pacientes em falha virológica, sabe-se que a presença de resistência às drogas da classe de inibidores da protease análogos de nucleosídeos (ITRN) não é um fator impeditivo na reciclagem das drogas desta classe na composição dos esquemas de segunda linha e subsequentes. Por outro lado, a inclusão dos inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN) deve ser evitada em pacientes expostos a medicamentos desta classe mesmo na ausência de mutações de resistência detectáveis (Paton et al, 2014; Aboyd et al., 2015; Matsuda et al, 2018).

Os inibidores da protease (IP) são a base para composição dos esquemas de resgate para pacientes que apresentam falha à terapia antirretroviral, pois possuem alta barreira genética combinada com alta potência, o que reduz a chance do surgimento de mutações associadas à resistência e favorece a resposta do paciente à terapia antirretroviral (Clutter et al., 2016; Ryon et al., 2018; Brasil, 2018). Portanto, a obtenção de informações sobre a resistência a estes antirretrovirais é um componente fundamental para o planejamento da terapia de resgate, considerando-se também que o uso prévio de algum IP pode limitar as opções de escolha de medicamentos desta classe (López-Cortés et al., 2016).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a polimerase do HIV-1 de pacientes do Estado de São Paulo que estão em falha virológica, já expostos a algum inibidor da protease (IP) e que realizaram genotipagem da polimerase viral no Instituto Adolfo Lutz Central (São Paulo, Brasil) entre janeiro de 2014 e dezembro de 2017.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os principais preditores da resistência aos inibidores da protease
- Avaliar o grau de susceptibilidade das sequências parciais da polimerase do HIV-1 aos principais inibidores da protease
- Avaliar a potencial influência dos subtipos do HIV-1 na resistência aos inibidores da protease

3. Metodologia

3.1 Comitê de Ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz de 17 de março de 2011 sob o Protocolo: 018/2011.

3.2 População do estudo

Trata-se de um estudo transversal, em que foram analisadas as sequências parciais do gene da polimerase do HIV-1 em amostras de pacientes vivendo com HIV, em falha virológica e que já tomaram algum inibidor da protease durante o seu tratamento. Há um componente retrospectivo referente à coleta de dados do histórico da doença, por meio de revisão de fichas clínicas preenchidas pelo médico assistente e dos bancos de dados do laboratório.

Foram incluídos neste estudo os pacientes com diagnóstico de Infecção pelo HIV-1, em acompanhamento clínico ambulatorial ou hospitalar em Unidades Públicas de Saúde (SUS) de diferentes regiões do Estado de São Paulo, tais como: Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS-SP e outros. Estes pacientes foram atendidos pelo laboratório de genotipagem do HIV do Instituto Adolfo Lutz no período de janeiro de 2014 a dezembro 2017 para realizar o exame de genotipagem do HIV-1 e preencheram os critérios de inclusão listados abaixo.

➤ Critérios de inclusão:

- Paciente possuir disponíveis no laboratório de genotipagem do HIV uma ou mais sequências parciais do gene da polimerase do HIV-1;
- Estas sequências terem sido geradas por pedido médico contendo com as informações básicas sobre o paciente (dados demográficos);

- Paciente estar em falha virológica no momento da realização do teste de genotipagem;
- Paciente estar em terapia antirretroviral no momento da realização do teste de genotipagem;
- Disponibilidade do histórico de antirretrovirais do paciente;
- Paciente com histórico de exposição a algum inibidor da protease no decorrer de seu tratamento.

➤ Critérios de exclusão:

- Paciente com idade inferior a 18 anos no momento da realização do teste de genotipagem;
- Sequências referentes às reentradas de um mesmo paciente;
- Sequências mal identificadas no banco de dados do laboratório;
- Sequências sem a protease ou a transcriptase reversa;
- Sequências idênticas ou duplicadas;
- Falta de dados demográficos básicos do paciente.

Foram obtidas 3343 sequências parciais do gene da polimerase viral de pacientes que entraram no laboratório com solicitação de teste de genotipagem, durante o período anteriormente mencionado. Um refinamento inicial foi feito, no qual algumas sequências que estavam duplicadas (por terem sido sequenciadas mais de uma vez ou salvas como dois tipos de arquivos diferentes) e, também, aquelas que estavam nomeadas com a impossibilidade de determinar o ano de origem (mal identificadas), foram retiradas do estudo. Ao final desta etapa, 56 sequências foram excluídas, reduzindo o escopo para 3287 sequências.

Ademais, 1189 sequências referentes aos vírus isolados de pacientes classificados no banco de dados do laboratório como virgens de tratamento (ou seja,

nunca expostos a nenhum antirretroviral) foram removidas após confirmar esta informação na ficha de solicitação do exame, assim como na ficha de retirada de medicamentos disponível no SICLOM web (Sistema de Controle Logístico de Medicamentos). Foram retiradas também 10 sequências que não continham a protease ou a transcriptase reversa viral, 143 sequências que pertenciam a pacientes menores de dezoito anos de idade e 111 sequências referentes à segunda ou demais entradas de um mesmo paciente.

Das 1834 sequências restantes, também foram removidas 138, referentes a pacientes que não haviam sido expostos a nenhum inibidor da protease ao longo de seu tratamento. Com isso, 1696 sequências parciais do gene da polimerase do HIV-1 foram selecionadas para a realização deste estudo. Estas informações podem ser visualizadas no esquema de seleção de sequências, apresentado na figura 5.

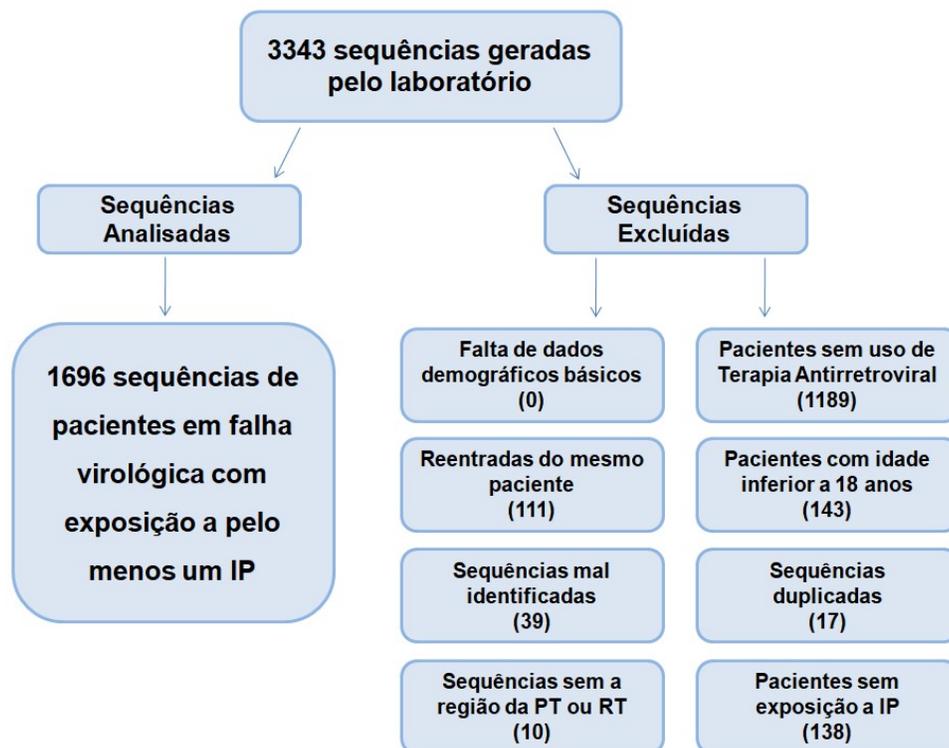


Figura 5: Esquema de seleção das sequências parciais do gene da polimerase do HIV-1 analisadas no estudo.

3.3 Metodologia Laboratorial utilizada para obtenção das sequências

3.3.1 Coleta e Processamento do Material Biológico

Por meio de punção de veia periférica, foram coletados cerca de 24 mL de sangue total em tubos de volume aproximado de 8 mL, contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético). Os tubos foram encaminhados ao laboratório de genotipagem do HIV do Instituto Adolfo Lutz, dentro do prazo de seis horas após a coleta de sangue e mantidos refrigerados. Os tubos foram centrifugados durante vinte minutos a 2000 rpm para separação do plasma, do anel leucocitário contendo células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e das demais células do sangue periférico.

Após a centrifugação, foram coletadas alíquotas de 1mL de plasma e alíquotas de 500 µL de PBMC, em tubos de 2,5 mL, as quais foram armazenadas em *freezer* a -70°C até o momento da extração do material genético.

3.3.2 Quantificação da Carga Viral e Contagem de Células TCD4⁺

As informações sobre células TCD4⁺ e Carga Viral dos pacientes foram avaliadas em dois momentos distintos, sendo a primeira avaliação referente aos últimos exames disponíveis anteriormente à genotipagem, e a segunda no momento em que a amostra foi recebida para a realização da genotipagem.

Os dados de Carga Viral (CV) e de células TCD4⁺ anteriores à recepção da amostra pelo laboratório de genotipagem do HIV foram obtidos da ficha de pedido de exame preenchida pelo médico, a qual foi recebida juntamente com a amostra, ou, quando estes dados não estavam disponíveis na ficha, foram obtidos consultando-se a plataforma SISCEL web.

A quantificação da carga viral foi realizada após a recepção da amostra, por meio do conjunto de reagentes da Abbott Real Time HIV-1 (ABBOTT Molecular, INC). A

contagem das células TCD4+ foi realizada no centro de imunologia do Instituto Adolfo Lutz central, por meio de citometria de fluxo (FACS Calibur, BD, San José, SA, EUA).

3.3.3 Extração do material genético: RNA viral

Para efetuar a extração do RNA viral foram utilizados 140 µL do plasma aliquotado e *kit* comercial de extração da marca Qiagen (QIAamp Viral RNA Mini Kit), seguindo-se rigorosamente as orientações do fabricante.

No caso das amostras de pacientes que possuíam viremia plasmática entre 200 e 1.000 cópias/ mL, anteriormente ao processo de extração foram centrifugadas duas alíquotas de 1 mL cada de plasma, a 1800 rpm, a 4 °C, durante 60 minutos, concentrando as partículas virais no fundo do tubo de 2,5 mL.

Depois de centrifugadas, 930 µL do sobrenadante de ambos os tubos foram coletados e armazenados em um novo tubo, para a eventual necessidade de futuras análises sorológicas. Os 70 µL de amostra que restaram em cada tubo foram reunidos para realizar as etapas de extração da mesma maneira que as demais amostras que continham viremia superior a 1.000 cópias/ mL. Em alguns pacientes com viremia superior a 1.000 cópias/ mL, foi utilizado o RNA extraído automaticamente no equipamento de extração M2000 da Abbott (M2000 *RealTime System*).

O material genético extraído foi armazenado em freezer a -70 °C até o momento de seu uso.

3.3.4 Amplificação do RNA viral: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A etapa seguinte à extração do material genético do vírus foi a amplificação da região alvo (Polimerase) por PCR, ou seja, amplificação dos genes da Protease (PT) e da Transcriptase Reversa (RT), em um único fragmento.

Em uma parte das amostras, os genes da PT e RT foram amplificados utilizando-se o TRUGENE® HIV-1 Genotyping Assay/OpenGene®DNA System (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY). Nas demais amostras, os genes foram amplificados por meio de técnica *in house* de *One Step RT-PCR* (etapa combinada de retrotranscrição e amplificação, em que ambas ocorrem no mesmo tubo). As duas metodologias partem do RNA extraído.

A metodologia *in house*, descrita nas tabelas 8 e 9, consiste em dois passos, sendo o primeiro constituído por retrotranscrição e amplificação (RT-PCR) e o segundo por amplificação mais específica, pois abrange uma região menor, a PT e RT (*nested PCR*).

Tabela 8: Detalhamento do protocolo de RT-PCR utilizado no laboratório para amplificação da região da polimerase (genes da protease e transcriptase reversa) do HIV-1, para o volume de 10 microlitros de RNA.

1º Passo: RT-PCR - Protocolo Aberto	
Reagentes	Quantidade em µL para uma amostra (10 µL de RNA)
Nuclease Free Water	26,25
10x PCR Buffer High Fidelity	5
50 mM MgSO ₄	2
10 mM dNTP	1,5
0,1 M DTT	2,5
Inibidor RNase (Biolabs) 40 U/µL	0,25
RT Superscript III 200 U/µL	0,25
Taq Platinum <i>High Fidelity</i> 5 U/µL	0,25
Primer: GAG2 (F) 10 pm/µL	1
Primer: RT137 (R) 10 pm/µL	1

Condições de Ciclagem da RT-PCR	
Número de Ciclos	Temperatura e Tempo
1	50°C - 30 minutos
1	94°C - 5 minutos
18	94°C - 30 seg./ 50°C - 30 seg./ 68°C - 2 min. e 30 seg.
17	94°C - 30 seg./ 53°C - 30 seg./ 68°C - 2 min. e 30 seg.
1	68°C - 10 minutos

Primers	Sequência
GAG2	GAGGAAGCTGCAGAATGGG
RT137	TTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGC

A tabela 8 mostra os reagentes e as quantidades de cada um deles para efetuar a amplificação da região da polimerase de uma amostra contendo 10 µL de RNA extraído. Ou seja, para amplificar esta região do vírus isolado de um paciente, é necessário providenciar uma combinação de reagentes, conforme segue: 10 microlitros do RNA extraído do plasma do paciente; 26,25 microlitros de *Nuclease Free Water*; 5 microlitros de 10x PCR *Buffer High Fidelity*, obtendo-se uma mistura (*mix*) de reagentes no total de 40 microlitros, aos quais são acrescentados os 10 microlitros de RNA.

Na parte inferior da tabela estão apresentadas as condições de ciclagem para que a reação de *One Step* RT-PCR seja bem sucedida. Após o *mix* estar pronto,

este é colocado em um termociclador programado para seguir as determinadas etapas: a primeira delas teve um ciclo com temperatura de 50°C que se manteve durante 30 minutos para que a enzima transcriptase reversa (RT Superscript III), presente no mix de reagentes descrito acima, sintetize uma fita de DNA complementar à fita molde de RNA do vírus presente no *mix*. A segunda teve um ciclo com temperatura de 94°C durante cinco minutos para que as fitas de DNA complementares formadas no ciclo anterior fossem desnaturadas, isto é, separadas umas das outras.

As terceira e quarta etapas, formadas por dezoito e dezessete ciclos cada uma, têm por objetivo desnaturar novamente as fitas de DNA complementar (94°C por 30 segundos), assim como anelar os *primers* a estas fitas (50°C e 53°C por 30 segundos) e promover a extensão dos fragmentos de DNA, com a ação da enzima DNA polimerase, que estende os *primers* e sintetiza as novas fitas de DNA no tamanho desejado.

Tabela 9: Detalhamento do protocolo de Nested PCR utilizado no laboratório para amplificação da região da polimerase (genes da protease e transcriptase reversa) do HIV.

2º Passo: Nested PCR – Protocolo Fechado	
Reagentes	Quantidade para 1 amostra (µL)
Go Taq Green Master Mix 2x	12,5
Primer: PR3 10 pm/µL	1
Primer: RT12 10 pm/µL	1
Nuclease Free Water	8
Amostra (proveniente do 1º PCR)	2,5
Condições de Ciclagem Nested PCR	
Número de Ciclos	Temperatura e Tempo
1	94°C - 3 minutos
35	94°C - 30 seg./ 55°C - 30 seg./ 72°C - 1 min. e 30 seg.
1	72°C - 10 minutos
Primers	Sequência
PR3	AGAGCCAACAGCCCCACCA
RT12	ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA

A tabela 9 descreve a segunda etapa de PCR, denominada *nested* PCR, que possui basicamente os mesmos passos presentes na RT-PCR, com exceção da retrotranscrição que agora não é mais necessária, pois neste momento já foi obtido o fragmento de cDNA necessário para a reação de PCR. Por se tratar de um segundo PCR, em que se busca amplificar uma região um pouco menor do que o primeiro, os *primers* utilizados são diferentes daqueles contidos no primeiro PCR, porém os reagentes e as ciclagens são os mesmos (exceto aqueles necessários para a retrotranscrição) e possuem as mesmas funções. Cabe ressaltar que alguns dos reagentes mencionados na tabela anterior ainda estão presentes na reação, porém, por se tratar de um protocolo fechado, estes reagentes estão contidos no *Go Taq Green Master Mix*.

Eletróforese em Gel de Agarose: A fim de verificar se a reação de PCR foi bem sucedida, ou seja, se houve a amplificação da região desejada, foi realizada a corrida de eletróforese com o produto das reações de PCR.

O gel de corrida foi preparado com agarose a 1%, corada com *SYBERTM Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, California, USA)* e tampão borato EDTA (TBE). Esta suspensão foi aquecida em microondas até que a agarose estivesse totalmente dissolvida e, quando pronta, foi colocada sobre a placa de eletróforese, com o pente mergulhado nela, e mantida em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos, até ser totalmente polimerizada.

Após a polimerização do gel, este foi colocado na cuba de eletróforese, mergulhado em TBE, e o produto das reações de PCR adicionado aos poços formados no gel pelo pente de eletróforese. A corrida foi programada para durar 30 minutos a 400 miliampères, 90 watts e 100 volts.

Ao final da eletróforese, a revelação das bandas presentes no gel foi feita em luz ultravioleta e as bandas do material amplificado foram comparadas ao padrão de peso molecular *DNA Mass Ladder (Invitrogen, California, USA)* para verificar se os fragmentos obtidos possuíam o tamanho aproximado de 1.000 pares de bases, conforme o esperado, e também para avaliar a intensidade, em nanomols, das bandas obtidas.

3.3.5 Sequenciamento do produto amplificado

A etapa seguinte à amplificação da região alvo foi o sequenciamento genético pela técnica de Sanger, a qual revela a sequência de nucleotídeos que constitui a região analisada do vírus.

Para o sequenciamento, é necessário preparar o mix no qual são adicionados: água livre de RNase e de DNase, *primer*, tampão de sequenciamento, *kit* DNA Sequencing–Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – ABI Prism® (Life Technologies, USA) e o produto amplificado.

Para executar o sequenciamento da região da polimerase de uma amostra é utilizado um conjunto com oito *mix* de sequenciamento, cada um com um *primer* diferente, dos quais quatro são para o gene da protease e outros quatro para o gene da transcriptase reversa. As tabelas 10 e 11 apresentam com detalhes os reagentes e os *primers* utilizados nesta reação, que é composta por 8,5 microlitros de *mix* e 1,5 microlitros do produto de *nested* PCR, totalizando 10 microlitros por reação.

Tabela 10: Reagentes e quantidades necessárias para preparar o mix de uma reação de sequenciamento.

Reagentes do Mix de Sequenciamento	Quantidade em microlitros
<i>Kit</i> Big Dye™ Terminator (Applied Biosystems)	0,5
2,5x <i>Buffer Sequencing</i> (Applied Biosystems)	4
H2O DNase e RNase free	2,4
<i>Primers</i> (1 pm/ µL)	1,6
Produto amplificado (10 - 20 ng)	1,5

Tabela 11: *Primers* utilizados na reação de sequenciamento da região da Polimerase do HIV-1 (Protease e Transcriptase Reversa).

Primers	Sequência (5' - 3')	Gene
DP10	TTTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGACA (F)	PT
DP11	CCATTCTGGCTTTAATTTTACTGGTA (R)	PT
DP16	CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC (F)	PT
DP17	AAAATTTAAAGTGCAGCCAAT (R)	PT
F1	GTTGACTCAGATTGGTTGCAC (F)	RT
RT2882	GGNGAYGCATATTTTCARTWCCC (F)	RT
RT2949	CCTGGTGYTCATRRITTRYAC (R)	RT
RT12	ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA (R)	RT

As reações foram feitas em placa de 96 poços (Life Technologies, USA), cada poço correspondendo a uma reação. Cada coluna da placa era equivalente ao sequenciamento da polimerase do vírus de um paciente e cada linha a um *mix* com um determinado *primer*.

Por exemplo, em cada poço da linha A foram acrescentados 8,5 microlitros de *mix* com o *primer* DP10, na coluna B foram acrescentados 8,5 microlitros de *mix* com o *primer* DP11 por poço, e assim por diante. Na coluna 1, em cada poço foram acrescentados 1,5 microlitros do produto amplificado do vírus do paciente P1, na coluna 2 foram acrescentados 1,5 microlitros do amplificado do vírus do paciente P2 e assim por diante.

Após ter pipetado 10 microlitros em cada poço (8,5 µL do *mix* de sequenciamento e 1,5 µL do produto amplificado do vírus do paciente), a placa foi selada e levada ao termociclador, com as seguintes condições de ciclagem: 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a reação de sequenciamento, o material foi purificado e precipitado com etanol e acetato de sódio, conforme o protocolo recomendado pela Life Technologies.

Dez microlitros de formamida *Hi-Di* foram inseridos em cada um dos poços e a placa foi novamente levada ao termociclador por mais quatro minutos, a 94°C, e imediatamente resfriada ao fim da ciclagem (etapa de desnaturação). Posteriormente, foi levada ao sequenciador automático ABI Prism 3130XL *Genetic Analyzer* da Life Technologies, USA. Após esta etapa, as sequências obtidas foram

editadas por meio dos softwares Sequencher 4.7 (Gene Codes) ou RECall (<http://pssm.cfenet.ubc.ca>).

3.4 Análises Moleculares

3.4.1 Determinação do Subtipo Viral

Para determinar o subtipo viral das sequências analisadas foi criado um arquivo polifasta no BioEdit contendo todas as sequências que foram analisadas. Este arquivo foi então submetido ao REGA HIV-1 Subtyping Tool -Version 2.0 (<http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>), ao jumping profile Hidden Markov Model – jpHMM (http://jphmm.gobics.de/submission_hiv) e ao National Center for Biotechnology Information - NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>).

Foram utilizados estes três *softwares* “online” para reduzir a chance de erro de classificação do subtipo viral. Os resultados foram colocados lado a lado em uma planilha de Excel e em uma quarta coluna foi atribuído o resultado final, o qual consistiu no desfecho apresentado por pelo menos dois dos três *softwares* utilizados para esta análise.

3.4.2 Grau de Susceptibilidade aos Antirretrovirais (ARV) – *Genotypic Susceptibility Score (GSS)*

A avaliação do grau de susceptibilidade aos antirretrovirais (ARV) foi feita por meio do algoritmo de Stanford University HIV Drug Resistance Database – HIVdb (Stanford HIVdb - <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations/>). Para isso, o mesmo arquivo polifasta gerado no BioEdit foi submetido a esta plataforma online, a qual retornou uma base de dados contendo um *score*, na escala de 0 a 1, para cada antirretroviral disponível, de acordo com as mutações e polimorfismos que cada sequência possuía.

De acordo com esse *score*, a análise de Stanford prediz a susceptibilidade de cada droga antirretroviral de acordo com a seguinte escala: 0 representa alto nível de resistência do vírus ao antirretroviral; 0,25 resistência intermediária; 0,5 baixo nível de resistência; 0,75 nível potencialmente baixo de resistência e 1 equivale a nenhum grau de resistência ao antirretroviral. Foram analisados tanto o GSS total, que compreende a soma dos scores de cada ARV da classe considerado pelo *software*, como o GSS para cada ARV de cada uma das três classes (Análogos de Nucleosídeos, Não Análogos de Nucleosídeos e Inibidores da Protease).

3.4.3 Mutações associadas à resistência

A determinação das mutações associadas à resistência aos ARV foi feita utilizando-se o algoritmo de Stanford HIVdb. Os *softwares* Stanford HIVdb permitem efetuar a submissão de arquivos polifasta contendo as sequências a serem analisadas e geram bases de dados que mostram as mutações de resistência e também os polimorfismos presentes em cada uma das sequências para as classes de ARV: análogos de nucleosídeos, não análogos de nucleosídeos, inibidores da protease e para as drogas de nova classe.

As sequências foram agrupadas em um arquivo polifasta, assim como foi feito para as demais análises mencionadas anteriormente, para serem submetidas aos *softwares* online de análise das mutações associadas à resistência.

3.5 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados no programa estatístico Stata v8 (Stata Corp, USA). Os resultados das variáveis contínuas foram expressos como mediana e intervalo interquartil (IQR: 25th-75th). Mid-p 95% foi usado para calcular o intervalo de confiança. Para a comparação de duas ou mais variáveis contínuas entre dois ou mais grupos, foram utilizados os testes de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis, respectivamente. As variáveis dicotômicas foram comparadas pelo teste Chi de

Pearson e pelo teste Exato de Fisher. Regressões logísticas foram usadas para avaliar a independência entre associações.

Para as regressões logísticas, as variáveis não dicotômicas foram dicotomizadas, em: Viremia baixa ($\log_{10} < 3$ vs. $\log_{10} > 3$) ou viremia alta ($\log_{10} < 5$ vs. $\log_{10} > 5$); Idade, como quartil inferior versus os três outros quartis (≤ 36 anos vs. > 36); Contagem de células T CD4 em dois cortes na análises (< 200 vs. > 200 e < 500 vs. > 500 células/mm³); GSS, como susceptível (score 1) vs. qualquer nível de resistência (score < 1); Tempo de tratamento, em dois cortes nas análises: menor quartil vs. três maiores quartis e abaixo vs. acima da mediana; Número de esquemas (1 ou 2 vs. mais de 2). Os três subtipos identificados foram comparados dois a dois (B vs. C; F vs. C; B vs. F).

As variáveis dicotomizadas que geraram uma associação mais significativa foram selecionadas para as análises de regressão logística. Variáveis que apresentaram $p \leq 0,2$ na regressão logística não ajustada foram retidas para as análises ajustadas. O nível de significância estatística assumido na análise ajustada foi de $p < 0,05$ (teste bicaudal).

4. Resultados

Durante o período de janeiro de 2014 a dezembro de 2017, 3343 sequências parciais do gene da polimerase (protease e transcriptase reversa) do HIV-1 foram geradas pelo Laboratório de Retrovírus do Instituto Adolfo Lutz para realizar o exame de genotipagem desta região do genoma viral. De acordo com os critérios de inclusão e com a proposta deste estudo, foram analisadas 1696 sequências referentes a pacientes com histórico de exposição a pelo menos um IP.

As amostras recebidas pelo Laboratório de Retrovírus do Instituto Adolfo Lutz no período mencionado foram, em geral, de pacientes residentes em diferentes regiões do Estado de São Paulo, como capital, ABC e interior, que estão em acompanhamento e realizam a retirada de medicamentos pelo Sistema Único de Saúde.

A tabela 12 descreve as características demográficas e laboratoriais dos 1696 pacientes em falha virológica, com histórico de uso de pelo menos um inibidor da protease, de acordo com a presença (27,5%; 466/1696) ou ausência (72,5%; 1230/1696) de uma ou mais mutações principais associadas à resistência para a classe dos IP (IP-DRM).

Tabela 12: Características demográficas e laboratoriais dos pacientes no momento da coleta para genotipagem da polimerase (PT + RT) do HIV-1.

	Total	Exp. IP com Mutação	Exp. IP sem Mutação
Número de Pacientes	1696	466 (27,5%)	1230 (72,5%)
Sexo Masculino (%)	984 (58%)	281 (60,3%)	703 (57,2%)
Idade (em anos)	43 (36 - 51)	46 (40 - 53)	42 (34 - 50)
Número de esquemas	2 (1 - 4)	4 (2 - 5)	2 (1 - 3)
Tempo em TARV (em anos)	8 (4 - 14)	13 (8 - 17)	6 (2 - 12)
Contagem de T CD4+ ¹	271 (135 - 467)	289 (139 - 494)	263 (131 - 457)
CV de HIV-1 RNA ²	3,79 (3,02 - 4,65)	3,73 (2,95 - 4,57)	3,82 (3,04 - 4,69)
CV < 3 (%)	368 (24,2%)	116 (26,9%)	252 (23,2%)
CV > 5 (%)	412 (24,3%)	93 (20%)	319 (25,9%)
Subtipos (%)			
HIV-1 B	1216 (71,7%)	338 (72,5%)	878 (71,4%)
HIV-1 C	87 (5,1%)	9 (1,9%)	78 (6,3%)
HIV-1 F	168 (9,9%)	58 (12,5%)	110 (8,9%)
Recombinantes BC	17 (1,0%)	3 (0,6%)	14 (1,1%)
Recombinantes BF	194 (11,4%)	56 (12,0%)	138 (11,2%)
Outros	14 (0,8%)	2 (0,4%)	12 (1,0%)
Mutações (%)			
ITRN	1181 (69,6%)	444 (95,3%)	737 (59,9%)
ITRNN	1016 (59,9%)	273 (58,6%)	743 (60,4%)
IP	466 (27,5%)	466 (100%)	0 (0%)

¹céls/mm³

²log₁₀

Resultados expressos como mediana e amplitude interquartil

Mutações de acordo com o Stanford HIV Resistantcedb

TARV: Terapia Antirretroviral; CV: Carga Viral; ITRN: Inibidores da Transcriptase Reversa análogos de Nucleosídeos; ITRNN: Inibidores da Transcriptase Reversa Não-análogos de Nucleosídeos; IP: Inibidores da Protease; Outros: subtipos com outras classificações que não B, C, F ou suas formas recombinantes; Exp.: Exposição.

Das 1696 sequências analisadas, 1181 apresentaram pelo menos uma mutação associada à resistência para a classe dos ITRN (69,6%), enquanto que 59,9% (1016/1696) tiveram mutações para a classe dos ITRNN. Já para a classe dos IP, em 466 (27,6%) sequências foi identificada alguma DRM. Informação sobre a prescrição de algum IP específico estava disponível somente para parte dos pacientes (57,4%; 974/1696), embora os 1696 tenham histórico de uso de pelo menos um IP durante seu tratamento.

O lopinavir foi o IP mais prescrito (55,4%; 539/974), seguido pelo atazanavir (43,5%; 424/974). IP antigos, que atualmente não costumam ser mais utilizados, como o saquinavir, indinavir e nelfinavir, já foram prescritos para pelo menos 28%

dos pacientes (42/974, 102/974 e 131/974, respectivamente). O ritonavir foi usado tanto sozinho, como um IP ativo durante o início da era da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), quanto como um *booster* (intensificador) para outros IP. As drogas ARV como o tipranavir e o amprenavir foram usadas por menos de 1% dos pacientes (6/974 e 3/974, respectivamente).

A mutação associada à resistência mais frequente para a classe dos ITRN foi a M184, presente em 63% dos casos (1068/1696), e para a classe dos ITRNN foi a K103 (40,3%; 684/1696). Para a classe dos IP, as três mutações associadas à resistência mais comumente presentes foram a M46 (14,7%; 250/1696), a V82 (13,8%; 234/1696) e a I54 (13,3%; 225/1696). A proporção de sequências com mutações, para cada códon associado à resistência, pode ser visualizada na figura 6.

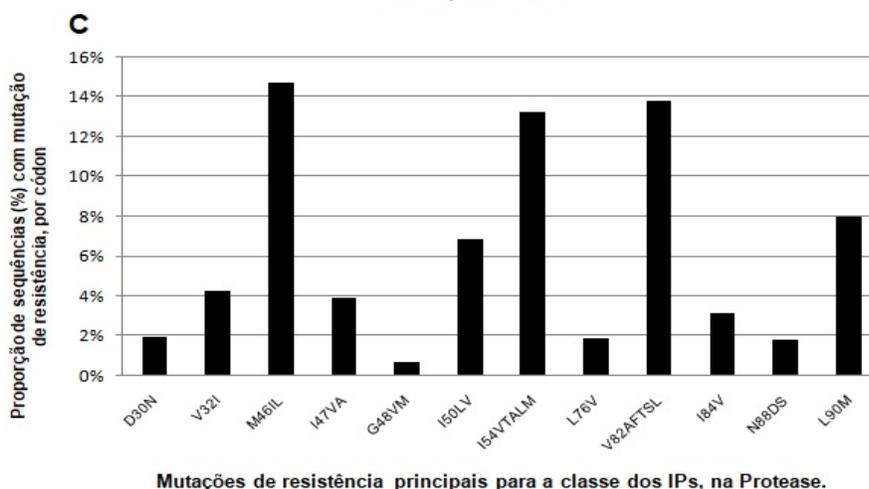
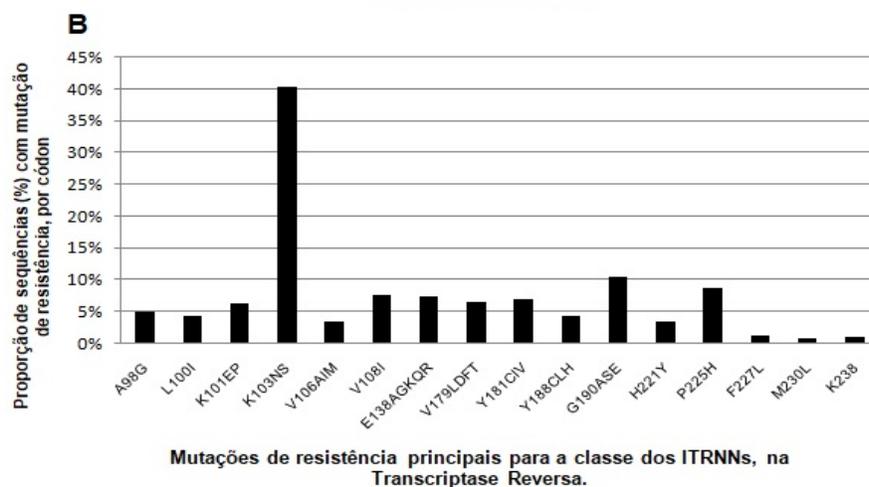
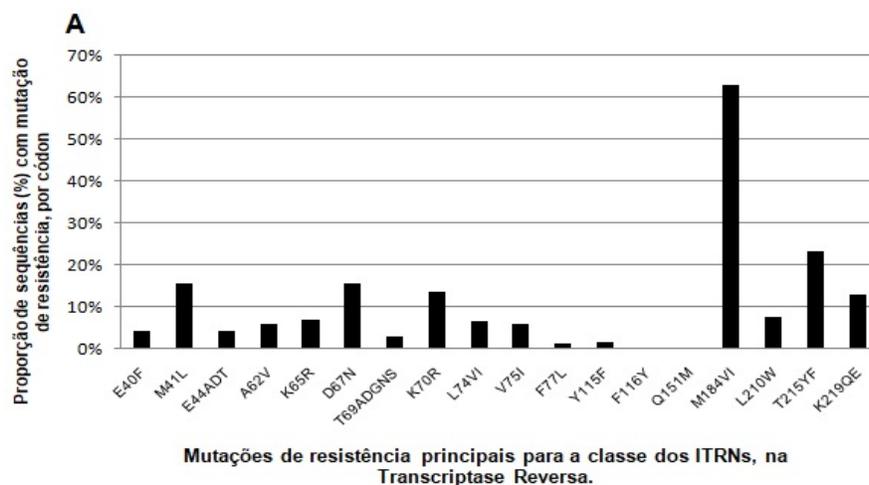


Figura 6: Mutações de resistência principais em pacientes com falha virológica expostos a pelo menos um IP. Percentual de sequências com mutações na protease (PT) e transcriptase reversa (TR) de acordo com cada códon associado à resistência, por classe de antirretroviral (ARV). (A) Mutações principais para a classe dos Inibidores da Transcriptase Reversa análogos de Nucleosídeos (ITRNs); (B) Mutações principais para a classe dos Inibidores da Transcriptase Reversa Não-análogos de Nucleosídeos (ITRNNs); (C) Mutações principais para a classe dos Inibidores da Protease (IP). Dados de acordo com o Stanford HIV Resistance Databases.

Um total de 23,8% (403/1696) das sequências apresentou mutações de resistência acessórias, não associadas diretamente com a resistência aos ARV. Estas mutações acessórias foram raras entre as sequências que não possuíam mutações de resistência principais para os IP (4% - 49/1230). Por outro lado, estavam presentes (de 1 até 5 mutações acessórias) na maior parte das sequências que continham pelo menos uma mutação principal para esta classe de ARV (76% - 354/466, $p < 0,001$). O número de mutações acessórias entre casos com pelo menos uma IP-DRM principal não diferiu significativamente entre os subtipos.

Para avaliar os potenciais preditores da resistência aos IP, análises de regressão logística foram realizadas. A tabela 13 apresenta as análises não ajustada (univariada) e ajustada (multivariada) de associação com a presença de pelo menos uma IP-DRM. A análise não ajustada sugere que a presença de pelo menos uma IP-DRM está fortemente associada ($p < 0,001$) com o paciente ter idade acima de 36 anos, ter usado mais do que dois esquemas de antirretrovirais, estar em tratamento por mais de sete anos e com a presença de pelo menos uma mutação de resistência para a classe dos ITRN.

Além desses fatores, a exposição a alguns IP, como lopinavir, darunavir e os IP mais antigos, também mostrou forte associação com a presença de IP-DRM. De fato, mais da metade dos pacientes com três ou mais IP prescritos possui vírus com pelo menos uma IP-DRM. Outras variáveis que apresentaram associação na análise não ajustada ($p < 0,2$) com a presença de alguma IP-DRM foram a contagem de células T CD4+ acima de 500 células/mm³ e a carga viral, tanto abaixo de 1.000 cópias por mL, quanto acima de 100.000 cópias por mL; porém a significância destas variáveis se perdeu na análise ajustada. O mesmo ocorreu para a idade e o número de esquemas utilizados pelo paciente.

A presença de alguma mutação para a classe dos ITRNN, assim como o sexo do paciente, não apresentaram significância estatística em nenhuma das regressões logísticas, sugerindo não haver associação destas variáveis com a presença de IP-DRM. Por outro lado, o fato de o paciente ter HIV-1 de subtipo F na polimerase, com significância estatística tanto na análise não ajustada ($p < 0,2$), quanto na ajustada

($p < 0,05$), sugere que haja associação deste subtipo viral com a presença de pelo menos uma IP-DRM.

Tabela 13: Regressão Logística para avaliar a associação das variáveis demográficas e laboratoriais com a presença de pelo menos uma mutação de resistência para a classe dos Inibidores da Protease (IP-DRM).

	Não ajustada			Ajustada		
	Odds ratio	P	95% IC	Odds ratio	p	95% IC
Idade acima de 36 anos	2,37	0,000	1,78 - 3,16	1,13	0,684	0,63 - 2,03
Sexo Masculino	0,88	0,241	0,71 - 1,09			
Contagem de CD4 >200 ¹	0,95	0,628	0,76 - 1,19			
Contagem de CD4 >500 ¹	1,21	0,142	0,94 - 1,57	1,21	0,484	0,71 - 2,04
Carga viral <1.000 cópias/mL	1,22	0,126	0,95 - 1,58	0,90	0,667	0,54 - 1,48
Carga viral >100.000 cópias/mL	0,81	0,184	0,58 - 1,11			
Tempo em tratamento > 7 anos	4,69	0,000	3,31 - 6,64	1,92	0,025	1,09 - 3,38
Número de regimes de ARV > 2	3,33	0,000	2,39 - 4,63	0,66	0,211	0,35 - 1,26
Mutação para os ITRN	13,50	0,000	8,67 - 21,03	14,73	0,000	6,80 - 31,90
Mutação para os ITRNN	0,93	0,494	0,75 - 1,15			
Exposição ao IDV, AMP, NFV	4,10	0,000	3,02 - 5,55	4,32	0,000	2,44 - 7,63
Tratamento com LPV	1,94	0,000	1,45 - 2,58	2,04	0,006	1,23 - 3,38
Tratamento com ATV	1,38	0,023	1,05 - 1,82	2,05	0,005	1,24 - 3,37
Tratamento com DRV	7,69	0,000	4,56 - 12,98	5,93	0,000	2,33 - 15,08
Subtipo F na <i>pol</i> do HIV-1	1,37	0,071	0,97 - 1,93	2,19	0,023	1,16 - 4,30

¹céls/mm³. Regressão logística das variáveis no momento da coleta para o exame de genotipagem da polimerase (protease + transcriptase reversa) do HIV-1 de pacientes em falha virológica e com exposição a pelo menos um IP, associadas ao grau de susceptibilidade (GSS) ao DRV. ARV: antirretroviral; IDV: indinavir; AMP: amprenavir; NFV: nelfinavir; LPV: lopinavir; ATV: atazanavir; DRV: darunavir; IC: Intervalo de Confiança; Pol: polimerase; ITRNN: Inibidores da Transcriptase Reversa Não-ânicos de Nucleosídeos; ITRN: Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos

A figura 7 apresenta o grau de susceptibilidade das sequências aos três principais antirretrovirais utilizados no Brasil (ATV, LPV e DRV). Como mostra a figura, estes IP apresentaram, respectivamente, predição de atividade plena em 71,8% (1218/1696), 75,4% (1278/1696) e 88,2% (1496/1696) das sequências avaliadas. O ATV apresentou atividade plena significativamente menor em sequências de subtipo F (63,7%, 107/168) do que naquelas de subtipo B (71,8%, 873/1216), com $p=0,03$.

Já a proporção de atividade plena ao DRV ou LPV entre sequências de subtipo F e B foi mais comparável, com 83,3% (140/168) das sequências de subtipo

F tendo atividade plena ao DRV vs. 88,1%(1071/1216) do subtipo B ($p=0,08$) e 70,8% (119/168) do subtipo F vs. 74,9% (911/1216) do subtipo B ($p= 0,26$) com predição de atividade plena ao LPV. Por outro lado, quando foram considerados apenas os casos em que houve mutação associada à resistência para a classe dos ITRN, tanto o DRV quanto o ATV tiveram menor GSS nas sequências de subtipo F em relação às de subtipo B (DRV: 76,1% (89/117) vs. 83,5% (726/870), com $p=0,05$; ATV: 50,4% (59/117) vs. 62,1% (540/870), com $p=0,016$).

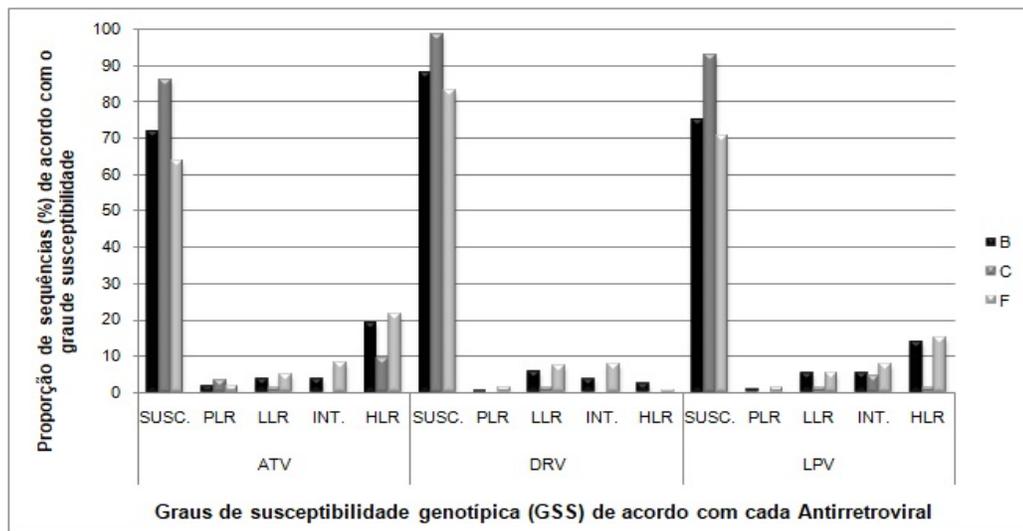


Figura 7: Percentual de seqüências parciais do gene da polimerase do HIV-1 (protease + transcriptase reversa) por subtipo (B, C e F), de acordo com o grau de susceptibilidade (GSS) aos antirretrovirais Atazanavir (ATV), Darunavir (DRV) e Lopinavir (LPV) de pacientes com viremia detectável, expostos a pelo menos um inibidor da protease (IP). GSS de acordo com o Stanford HIV Resistance Database. SUSC.: Susceptível; PLR.: Resistência potencialmente baixa; LLR.: Baixo nível de resistência; INT.: Resistência intermediária e HLR.: Alto nível de resistência para cada antirretroviral.

As regressões logísticas para avaliar os preditores da resistência ao DRV foram realizadas e seus resultados estão apresentados na tabela 14. Em semelhança à presença de alguma IP-DRM, a falta de atividade plena predita ao DRV mostrou estar associada às diversas variáveis na análise não ajustada, como idade superior a 36 anos, maior tempo de tratamento, uso de mais do que dois esquemas de ARV, uso de alguns IP, vírus de subtipo F e presença de mutação para a classe dos ITRN.

Entretanto, a significância não se manteve no modelo ajustado para a maior parte das variáveis, permanecendo apenas para o uso de DRV, de IP antigos e para HIV-1 de subtipo F na polimerase. A presença de ITRN-DRM, que apresentou forte associação com GSS baixo para o DRV, previu o resultado perfeitamente na análise ajustada, indicando que todos os casos com GSS baixo para o DRV possuíam também ITRN-DRM.

Tabela 14: Regressão logística para avaliar a associação das variáveis demográficas e laboratoriais com a resistência ao darunavir (DRV).

	Não ajustada			Ajustada		
	Odds ratio	P	95% IC	Odds ratio	P	95% IC
Idade acima de 36 anos	2,07	0,001	1,37 - 3,11	1,98	0,082	0,92 - 4,28
Sexo Masculino	0,87	0,363	0,64 - 1,18			
Contagem de CD4 >200 ¹	1,19	0,267	0,88 - 1,62			
Contagem de CD4 >500 ¹	0,77	0,190	0,52 - 1,14	0,6	0,146	0,30 - 1,20
Carga viral <1.000 cópias/mL	0,83	0,332	0,57 - 1,21			
Carga viral >100.000 cópias/mL	0,91	0,638	0,60 - 1,37			
Tempo em tratamento > 7 anos	2,7	0,000	1,70 - 4,30	1,11	0,769	0,60 - 2,24
Número de regimes de ARV>2	2,95	0,000	1,86 - 4,70	1,19	0,651	0,57 - 2,50
Mutação para os ITRN*	13,50	0,000	2,03 - 8,67			
Mutação para os ITRNN	1,11	0,520	0,82 - 1,50			
Exposição ao IDV, AMP, NFV	3,75	0,000	2,54 - 5,53	3,11	0,000	1,65 - 5,85
Tratamento com LPV	2,04	0,001	1,36 - 3,07	1,68	0,098	0,91 - 3,11
Tratamento com ATV	1,06	0,777	0,72 - 1,55			
Tratamento com DRV	8,17	0,000	4,96 - 13,47	3,95	0,000	1,83 - 8,54
Subtipo F na <i>pol</i> do HIV-1	1,48	0,083	0,95 - 2,30	2,23	0,021	1,13 - 4,40

¹céls/mm³. Regressão logística das variáveis no momento da coleta para o exame de genotipagem da polimerase (protease + transcriptase reversa) do HIV-1 de pacientes em falha virológica e com exposição a pelo menos um IP, relacionadas ao grau de susceptibilidade (GSS) ao DRV. *A presença de mutação para a classe dos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) não foi incluída na análise ajustada, apesar de apresentar p<0,2 na análise não ajustada, pois todos os casos predizem sucesso perfeitamente. ARV: antirretroviral; IDV: indinavir; AMP: amprenavir; NFV: nelfinavir; LPV: lopinavir; ATV: atazanavir; DRV: darunavir; IC: Intervalo de Confiança; *Pol*: polimerase; ITRNN: Inibidores da Transcriptase Reversa Não-análogos de Nucleosídeos.

A avaliação dos códons da protease viral associados à resistência mostrou que as sequências de subtipo C tiveram menor prevalência de IP-DRM na maior parte dos códons de resistência em relação às sequências de subtipo B e F, como mostra a tabela 15.

Tabela 155: Porcentagem, por subtipo, de mutações de resistência para a classe dos inibidores da protease (IP) no grupo de pacientes expostos a pelo menos um IP.

Aminoácido no vírus selvagem	Localização	Aminoácido na presença de mutação	HIV-1 Subtipos e Formas Recombinantes (%)						Total
			B	C	F	BC	BF	Outros	
D	30	N	2,5	0,0	1,2	0,0	0,5	0,0	4,2
V	32	I	4,5	0,0	4,8	0,0	4,6	0,0	13,9
L	33	F**	9,7	4,6	10,1	5,9	9,8	0,0	40,1
M	46	IL	15,2	2,3	16,7	17,7	16,0	7,1	75,0
I	47	VA	4,1	0,0	6,0	0,0	3,6	0,0	13,7
G	48	VM	0,8	0,0	0,6	0,0	0,5	0,0	1,9
I	50	LV	6,3	6,9	10,7	5,9	8,3	0,0	38,1
I	54	VTALM	13,5	2,3	13,7	0,0	18,0	7,1	54,6
L	76	V	1,6	0,0	3,0	0,0	3,6	7,1	15,3
V	82	AFTSL	13,6	4,6	12,5	5,9	21,1	7,1	64,8
I	84	V	3,8	1,2	1,8	0,0	1,6	0,0	8,4
N	88	DS*	2,0	0,0	2,4	0,0	1,0	7,1	12,5
L	90	M	8,7	2,3	8,9	0,0	6,7	0,0	26,6

*Nenhuma sequência apresentou o aminoácido D.

**O software Stanford HIV Resistance db considerou esta mutação como acessória e não como principal.

Outros: subtipos com outras classificações que não B, C, F ou suas formas recombinantes.

Considerando-se as principais mutações de resistência aos IP, é possível observar que menos sequências do subtipo C (10,3%; 987) apresentaram mutação em cada um dos códons associados à resistência na protease viral, em relação com as sequências de subtipo B (27,8%; 338/1216) e F (34,5%; 58/168), com $p < 0,001$. O número de sequências de subtipo F com IP-DRM também foi maior em comparação com as sequências de subtipo B, como apresentado na figura 8, porém não houve significância estatística ($p = 0,07$).

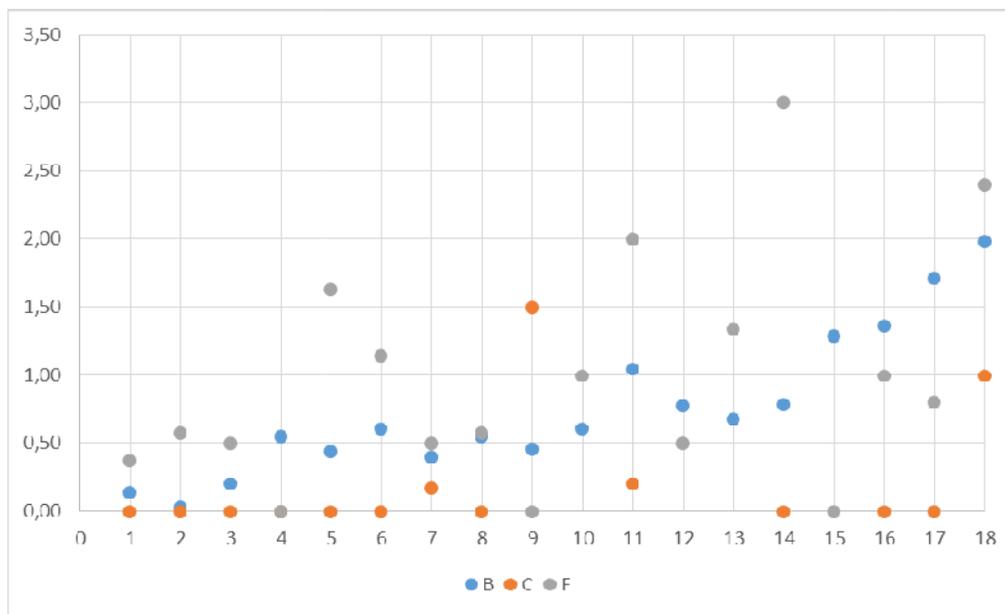


Figura 8: Número de mutações por sequência, de acordo com o subtipo na polimerase (protease + transcriptase reversa) do HIV-1 e com o tempo de tratamento dos pacientes.

Por mais que o tempo total de tratamento seja comparável para os pacientes com HIV-1 de subtipo B (8,7 anos; 4-14) e F (7 anos; 3-12), para aqueles com HIV-1 C o tempo de tratamento é menor (4,1 anos; 1-7), $p=0,001$. Além disso, os pacientes vivendo com HIV-1 de subtipo C usaram menos esquemas de ARV (2; 1-3) do que aqueles com vírus de subtipo B (3; 1-4) e F (2; 1-4), $p<0,01$.

Apesar da proporção de mutações por códon associado à resistência aos IP apresentar padrões similares, isto é, taxas similares para os subtipos B e F e taxas inferiores para o subtipo C (Tabela 15), alguns códons, como o I50, apresentaram taxas para o subtipo C mais comparáveis com as dos subtipos B e F.

Considerando-se especificamente a mutação I50L para o ATV, não há diferença estatística na proporção de sequências de subtipo C e B, tanto no geral (6,9%; 687 vs. 4,4%; 761216, $p=0,27$), assim como quando são analisados apenas os casos em que há exposição documentada ao ATV: 12,5% (324) para o subtipo C e 8,6% (26302) para o subtipo B, $p=0,77$. Entretanto, as sequências de subtipo C apresentaram taxas estatisticamente superiores às do subtipo B quando analisados apenas os casos em que houve alguma mutação para a classe dos ITRN (13,6%; 644 para o subtipo C vs. 6,1%; 53870 para o subtipo B, $p=0,05$) ou quando avaliados

apenas os casos com alguma IP-DRM (67%; 69 para o subtipo C vs. 16%; 53338 para o subtipo B, $p < 0,001$).

Embora nestes casos as sequências de subtipo C apresentem taxas de mutação no códon 50 da protease superiores em relação às sequências de subtipo B, observa-se que a predição de atividade plena ao ATV é mais comum para as sequências de subtipo C do que para as de subtipo B, tanto no geral (86,2%, 75/87 vs. 71,8%, 873/1216, $p = 0,004$), como entre os pacientes com exposição documentada ao ATV (C 87,5%, 21/24 vs. 65,2%, 197/302 em B, $p = 0,03$). Se analisados apenas os casos em que não há a mutação I50L, a atividade plena também é maior nas sequências de subtipo C do que nas de subtipo B (92,6%, 75/81 vs. 75,1% (873/1163), $p < 0,001$). O mesmo padrão ocorre para a mutação I50V.

Mutações no códon 50, tanto Valina quanto Leucina, são mais prevalentes em sequências de subtipo F do que naquelas de subtipo B ($p = 0,03$). Informações detalhadas sobre o uso atual de IP não estão disponíveis, mas a informação sobre o uso de diferentes IP, ainda que incompleta, não mostrou diferenças estatisticamente significantes quando as sequências de subtipo B e F foram comparadas.

Os nucleotídeos que compõem os códons associados à resistência poderiam facilitar o surgimento da resistência, mas as sequências de subtipo F não mostraram distinção clara de nucleotídeos em relação às de subtipo B. A maior parte das sequências sem mutação analisadas continham os nucleotídeos ATT (98,7%) no códon 50 da protease, taxa similar à descrita pelo Stanford db “HIV-1 *sequence variability tool*” para estes subtipos em países de baixa e média renda (99,8%) e nos Estados Unidos da América (98,6%). Os mesmos nucleotídeos estavam presentes em 99,6% das sequências de subtipo C de países de baixa e média renda avaliadas pelo Stanford db.

Outros códons analisados por este estudo em relação ao subtipo F eram formados pelos nucleotídeos ATC e ATW (A ou T) e as mutações também foram codificadas por códons similares aos observados para os subtipos B e C (CTT ou GTT). Os segmentos flanqueadores também são semelhantes, com 84,5% das

sequências apresentando GGGGA###GGAGGT, assim como descrito pelo Stanford db para os Estados Unidos da América (88,6%) e para os países de baixa e média renda (90%).

A tabela 16 mostra as regressões logísticas, não ajustadas e ajustadas, feitas para avaliar a presença de mutação de resistência no códon 50 da protease viral.

Tabela 16: Regressão Logística para avaliar a associação das variáveis demográficas e laboratoriais com a presença da mutação I50LV na protease do HIV-1.

	Não Ajustada			Ajustada		
	Odds ratio	P	95% IC	Odds ratio	p	95% IC
Idade acima de 36 anos	3,72	0,000	1,93 - 7, 17	2,30	0,141	0,76 - 6,97
Sexo Masculino	0,96	0,828	0,66 - 1,40			
Contagem de CD4 >200 ¹	0,87	0,478	0,58 - 1,29			
Contagem de CD4 >500 ¹	1,55	0,041	1,02 - 2,36	1,19	0,644	0,56 - 2,53
Carga viral <1.000 cópias/mL	0,93	0,774	0,58 - 1,50			
Carga viral >100.000 cópias/mL	0,77	0,395	0,42 - 1,40			
Tempo em tratamento > 7 anos	4,27	0,000	2,24 - 8,12	2,25	0,099	0,86 - 5,88
Número de regimes de ARV> 2	4,25	0,000	2,26 - 8,00	1,01	0,992	0,36 - 2,85
Mutação para os ITRN	18,23	0,000	5,77 - 57,65	19,54	0,004	2,61 - 146,10
Mutação para os ITRNN	1,26	0,249	0,85 - 1,87			
Exposição ao IDV, AMP, NFV	2,76	0,000	1,69 - 4,49	2,14	0,057	0,98 - 4,70
Tratamento com LPV	1,01	0,969	0,62 - 1,64			
Tratamento com ATV	4,67	0,000	2,67 - 8,18	4,35	0,000	1,99 - 9,51
Tratamento com DRV	4,76	0,000	2,63 - 8,64	4,07	0,002	1,65 - 10,05
Subtipo F na <i>pol</i> do HIV-1	1,80	0,033	1,05 - 3,09	3,36	0,003	1,50 - 7,52

¹ céls/mm³. Regressão logística das variáveis no momento da coleta para o exame de genotipagem da polimerase (protease + transcriptase reversa) do HIV-1 de pacientes em falha virológica e com exposição a pelo menos um IP, associadas ao grau de susceptibilidade (GSS) ao DRV. ARV: antirretroviral; IDV: indinavir; AMP: amprenavir; NFV: nelfinavir; LPV: lopinavir; ATV: atazanavir; DRV: darunavir; IC: Intervalo de Confiança; Pol: polimerase; ITRNN: Inibidores da Transcriptase Reversa Não-ânicos de Nucleosídeos; ITRN: Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos

Como pode ser visto na tabela 16, diversas variáveis demográficas e laboratoriais mostraram associação com a presença de mutação no códon 50 da protease viral. Porém, na análise ajustada, apenas a presença de mutação para a classe dos ITRN, exposição a algum IP e HIV-1 de subtipo F permaneceram com significância estatística.

5. Discussão

Os inibidores da Protease (IP) vêm sendo utilizados desde os anos noventa como parte da terapia antiretroviral combinada. Com o desenvolvimento de drogas da classe dos ITRNN e, mais recentemente, dos Inibidores da Integrase, os IP passaram a ser reservados para compor nos esquemas de resgate de segunda linha e subsequentes, para pacientes que estão em falha à terapia antiretroviral. Além disso, outro fator determinante para a utilização dos IP na composição dos esquemas de resgate consiste no fato de os IP possuírem alta barreira genética juntamente com alta potência, favorecendo a resposta do paciente ao tratamento (Clutter et al., 2016; Ryon et al., 2018).

O surgimento de mutações associadas à resistência aos medicamentos da classe dos IP não é tão frequente como para as classes dos ITRN e ITRNN. O fator que possivelmente seja responsável por reduzir as chances de surgimento de mutações associadas à resistência em pacientes que usam IP associados ao RTV, que nestes casos é utilizado com um *booster*, é a faixa estreita de concentração destes fármacos, que é baixa o suficiente para não permitir replicação viral, porém alta o suficiente para exercer a pressão seletiva do medicamento. Apesar das mutações fora da protease também serem sugeridas como mecanismo de resistência aos IP, nenhum padrão conclusivo de resistência foi identificado até então (Clutter et al., 2016; Sutherland et al., 2014).

Para verificar o grau de resistência na protease, bem como identificar os preditores do surgimento de IP-DRM, foi avaliado um grande conjunto de dados, sobre sequências parciais da polimerase do HIV-1 e informações laboratoriais e demográficas de pacientes que usaram pelo menos um IP ao longo de seu tratamento. Pelo menos uma mutação associada à resistência para os IP foi encontrada em aproximadamente um a cada quatro pacientes (27,5%; 466/1696).

O número de IP-DRM identificadas nos pacientes deste estudo foi maior do que o número encontrado em pacientes que estavam com falha no primeiro ou segundo esquema antirretroviral (Shafer, 2017; Matsuda et al., 2018). Porém, muitos pacientes pertencentes a este estudo usaram três ou mais esquemas (47,8%;

383/801), assim como também já foram expostos a dois ou mais IP e, não incomumente, permaneceram virêmicos por um certo período antes da realização da genotipagem. Este fato pode ter aumentado a chance do surgimento de mutações neste grupo. Indo de encontro com esta ideia, observou-se que houve associação clara entre o número de IP utilizados e o número de IP-DRM.

O lopinavir foi utilizado por muitos pacientes e as mutações de maior prevalência associadas a este fármaco, situadas nos códons 46, 54 e 82, foram também as mais prevalentes em estudos realizados em países de baixa e média renda que incluíram pacientes que estavam em falha a esquemas com o lopinavir como base (Thompson et al., 2018; Fily et al., 2018).

O uso do lopinavir e de outros IP, ainda utilizados ou mesmo os mais antigos, como indinavir, saquinavir e nelfinavir, teve associação com a presença de mutações. Porém, a falta de informações completas sobre o uso atual dos IP impediu efetuar uma avaliação mais aprofundada. Como o darunavir tem sido utilizado, até o momento, principalmente nos esquemas de resgate para pacientes falhando aos esquemas com outros IP, a associação deste fármaco com a presença de IP-DRM deve levar este fato em consideração.

Além disso, todo uso de IP foi considerado nas regressões logísticas e, como cerca de 50% dos pacientes usaram estes medicamentos sequencialmente, a inclusão de IP específicos na análise não foi feita para determinar seu papel na resistência, mas sim para avaliar se algum IP específico causaria impacto nas associações observadas. A presença de mutações de resistência para os ITRN mostrou forte associação com a presença de IP-DRM, com apenas 4,7% das sequências virais que continham alguma IP-DRM não possuindo mutação para os ITRN.

Apesar da associação poder derivar do fato de que a presença de mutações para outras classes usadas na combinação de antirretrovirais possa favorecer o surgimento de IP-DRM, acredita-se que mutações para os ITRN possam servir como indicativo de adesão adequada ao tratamento, ou seja, um potencial marcador de pressão seletiva suficiente em algum ponto para permitir o surgimento de IP-DRM.

O subtipo F do HIV-1 teve associação com a presença de IP-DRM tanto na regressão logística não ajustada, quanto na análise ajustada. Esta associação poderia ter se perdido na análise ajustada caso outro fator, como por exemplo o tempo de tratamento, fosse o responsável pela associação encontrada na primeira análise (que avaliou cada variável, individualmente, com presença de mutações de resistência aos IP) e não de fato o HIV-1 de subtipo F.

Isto ocorreu em relação ao HIV-1 de subtipo C que, apesar de ter apresentado associação na análise não ajustada (univariada), perdeu a associação quando as variáveis foram analisadas em combinação na regressão logística ajustada, mostrando que provavelmente outras variáveis explicassem o subtipo C ter associação com a presença de IP-DRM, que não o próprio subtipo em si.

Consistentemente com a introdução mais recente do subtipo C no Estado de São Paulo, as sequências deste subtipo apresentaram taxas de resistência inferiores na maior parte dos códons e, em todas as análises ajustadas, estas taxas pareceram ser dependentes de outras variáveis como menor tempo dos pacientes em tratamento e menor quantidade de esquemas utilizados. Como consequência, muitas IP-DRM não foram identificadas entre indivíduos infectados por HIV-1 de subtipo C.

Uma exceção ocorreu apenas no códon I50, no qual as taxas de mutação foram comparáveis entre sequências dos três subtipos e, até mesmo, significativamente maiores do que nas sequências de subtipo B em algumas sub-análises, como quando foram considerados apenas os pacientes com pelo menos uma IP-DRM. Entretanto, mais avaliações são necessárias.

As sequências de subtipo F, pelo contrário, tenderam a apresentar taxas marginalmente maiores de mutações de resistência na maior parte dos códons de resistência da protease. Apresentaram também associação com a resistência na maior parte das análises não ajustadas e permaneceram com associação estatística nas análises ajustadas para a presença de IP-DRM, níveis mais baixos de susceptibilidade ao DRV e ATV, assim como para a presença de mutação no códon I50. Apesar disto não ter sido reportado anteriormente, está de acordo com a

ferramenta do Stanford database “*Mutation Prevalence According to Subtype and Treatment*”, que registrou em seu conjunto de dados taxas elevadas de mutação no códon I50 entre as sequências de subtipo F de pacientes tratados.

Foi avaliada também a composição de nucleotídeos do códon 50 e da região flanqueadora para verificar as potenciais assinaturas moleculares que poderiam facilitar a evolução de resistência, porém, nenhuma foi identificada. Potenciais influências epistáticas, de outras regiões do genoma do HIV-1 de subtipo F, não foram avaliadas e não podem ser descartadas. Estes achados assumem maior relevância com a recente descrição de uma resposta mais baixa do subtipo F aos esquemas baseados nos inibidores da integrase (Cid-silva et al., 2018).

Associações entre o subtipo viral e mutações específicas já foram descritas anteriormente, como por exemplo a mutação V106M para a classe dos ITRNN, presente mais comumente em vírus de subtipo C, possivelmente pela necessidade de troca de apenas um nucleotídeo para mudar o aminoácido selvagem para o aminoácido de resistência (Grossman et al., 2004). A mutação K65R, que confere resistência ao TDF, fármaco da classe dos ITRN, tem sido associada com o subtipo C (Coutsinos et al., 2008) e a mutação V82M, para a classe dos IP, aparentemente é mais frequente em vírus de subtipo G (Grossman et al., 2004).

Um estudo realizado na Espanha sugeriu taxas inferiores de supressão virológica em pacientes usando diferentes esquemas, mas os polimorfismos comuns às sequências de subtipo F não apresentaram associação com os fármacos utilizados (Palma et al., 2012). Os autores sugeriram que a alta capacidade de replicação do vírus poderia desempenhar este papel. Isso levaria à viremia mais alta nos pacientes com vírus de subtipo F daquele estudo. Na população avaliada por este estudo, a carga viral dos pacientes que estavam em falha virológica era maior do que 100.000 cópias/mL em 20% dos pacientes com HIV-1 F, enquanto para aqueles com subtipo B era de 15% ($p=0,1$). Porém, isto pode não representar a viremia observada antes do uso de medicamentos antirretrovirais, visto que todos os pacientes avaliados por este estudo estavam falhando ao tratamento.

Existem muitas limitações neste estudo. Esta foi uma avaliação retrospectiva, na qual parte das informações não estavam completas, como informação sobre o tempo total em tratamento para todos os pacientes e informações detalhadas sobre a exposição a cada um dos IP já utilizados ao longo de todo o tempo de tratamento dos pacientes. Também não há informação sobre o uso atual de IP, apesar destes medicamentos serem recomendados pelos *guidelines* de tratamento para composição dos esquemas de resgate. As menores taxas de IP-DRM entre pacientes com menor tempo em tratamento podem estar associadas ao efeito protetor dos IP em relação ao surgimento de resistência ou simplesmente ao aumento da chance de desenvolver IP-DRM conforme maior tempo em terapia contendo algum IP.

Além disso, como alguns IP, como o DRV, foram reservados para a terapia de resgate, mesmo em esquemas para pacientes com falha aos esquemas com IP por causa de resistência, sua associação com a resistência à classe dos IP não é inesperada. Este estudo não conseguiu avaliar a associação dos IP individuais com a resistência. Foram incluídas todas as sequências que tinham um mínimo de dados demográficos e laboratoriais associados à elas e, portanto, os pacientes que não tiveram acesso à genotipagem ou que as sequências de seus vírus não foram amplificadas pelas metodologias utilizadas, não foram incluídas.

Por outro lado, no período do estudo foram recebidas amostras para o exame de genotipagem de grande parte dos serviços do Estado de São Paulo que prestam atendimento especializado às pessoas que vivem com HIV, representando, de certa forma, a população atual de pacientes que estão falhando ao tratamento antirretroviral nesta região.

Nas análises ajustadas, a inclusão no modelo de variáveis com informação disponível para apenas parte dos pacientes, implica em um tamanho menor da amostra. Porém, os resultados estão alinhados com as regressões logísticas realizadas utilizando-se apenas os dados disponíveis para todos os pacientes, como idade, sexo, informação sobre mutações de resistência e o subtipo viral. Por outro lado, estas informações são baseadas em um grande conjunto de sequências, com informações de subtipo e de resistência geradas com a utilização de plataformas

disponíveis na internet que são conhecidas e validadas, como o Stanford Database, NCBI e a ferramenta de genotipagem do Rega.

A adesão e a presença de níveis séricos adequados de fármaco são fatores essenciais para o surgimento da resistência e esta é uma questão importante quando se tenta avaliar potenciais associações com a presença de mutações de resistência aos antirretrovirais e o comprometimento da susceptibilidade a estes medicamentos. Neste caso, a utilização da presença de mutações para a classe dos ITRN pode servir como indicativo de adesão em algum momento, mas a informação adequada de adesão é uma limitação importante para as análises deste estudo.

6. Conclusões

As mutações de resistência principais aos IP, embora não tão altas quanto para a classe dos ITRN ou ITRNN, estão presentes em 27,5% das sequências do HIV-1 de pacientes com histórico de exposição a algum IP. Isto reduz a susceptibilidade dos IP disponíveis, inclusive ao darunavir, com apenas 57% das sequências possuindo predição de atividade plena a este medicamento entre os pacientes com pelo menos uma IP-DRM.

Dados demográficos, como maior tempo em tratamento, estão associados com a presença de alguma IP-DRM e a presença de mutações para a classe dos ITRN foi observada nas sequências virais de quase todos os pacientes com IP-DRM, podendo ser um indicativo de adesão mínima o suficiente para garantir o surgimento de resistência na protease do HIV-1.

O subtipo C do HIV-1, mais recentemente introduzido na área do estudo, mostrou associação com menor número de esquemas e menor tempo de tratamento dos pacientes que possuíam vírus com este subtipo, sendo provavelmente estes fatores os responsáveis pelas taxas mais baixas de resistência encontradas nestas sequências.

Por outro lado, o subtipo F mostrou taxas piores tanto para a presença de alguma IP-DRM, quanto para menor susceptibilidade para o atazanavir e darunavir. A presença de mutação no códon 150 pareceu ser mais frequente entre as sequências de subtipo não-B, mas não foram identificadas quaisquer assinaturas no códon ou próximas a ele que justificassem estes achados.

A realização de futuras análises que considerem e avaliem as limitações deste estudo se faz necessária e pode favorecer na compreensão dos achados apontados neste trabalho.

7. Referências Bibliográficas

ANDINO, Raul; DOMINGO, Esteban. Viral quasispecies. **Virology**, [s.l.], v. 479-480, p.46-51, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.022>.

A Timeline of HIV and AIDS. 2016. Disponível em: <<https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/history/hiv-and-aids-timeline>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

Abbas AK, Lichtman AH. Vírus da Imunodeficiência Humana Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. *In*: Imunologia Celular e Molecular. 5º ed. Elsevier: 2005.

Avert. **History of HIV and AIDS Overview**: Global information and education on HIV and AIDS. 2018. Disponível em: <<https://www.avert.org/professionals/history-hiv-aids/overview>>. Acesso em: 10 maio 2018.

Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J, de Béthune MP, Kraus G, Boven K, Jochmans D, Van Craenenbroeck E, Picchio G, Rimsky LT. TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Feb; 54(2):718-27.

Bachelor LT, Anton ED, Kudish P, Baker D, Bunville J, Krakowski K, Bolling L, Aujay M, Wang XV, Ellis D, Becker MF, Lasut AL, George HJ, Spalding DR, Hollis G, Abremski K. Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing efavirenz combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Sep;44(9):2475-84.

Baltimore, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*. 1970 Jun; 27;226(5252):1209-11.

BARROS, Sandra Garrido de; VIEIRA-DA-SILVA, Ligia Maria. A terapia antirretroviral combinada, a política de controle da Aids e as transformações do Espaço Aids no Brasil dos anos 1990. **Saúde debate**, Rio de Janeiro, v. 41, n. spe3, p. 114-128, set. 2017. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-11042017000700114&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 12 set. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-11042017s309>.

Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*.2009;4(3):e4724.

BOYD A., Mark et al. Baseline HIV-1 resistance, virological outcomes, and emergent resistance in the SECOND-LINE trial: an exploratory analysis. **The Lancet HIV**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.42-51, fev. 2015. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2352-3018\(14\)00061-7](http://dx.doi.org/10.1016/s2352-3018(14)00061-7).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos**. Última modificação: 29.08.2018 Data da publicação: 03.10.2013

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.AIDS.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55308/protocolo_13_3_2014_pdf_28003.pdf>. Acesso em: 24/04/2018)

BRÍGIDO, L. f. m. et al. Southern Brazil HIV Type 1 C Expansion into the State of São Paulo, Brazil. **Aids Research And Human Retroviruses**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.339-344, mar. 2011. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.2010.0157>.

Cahn, P.; Villacian,J.; Lazzani, A.; Katlama, C.; Grinsztejn, B.; Arasteh, K.; López, P.; Clumeck, N.; Gerstoft, J.; Stavrianeas, N.; Moreno, S.; Antunes, F.; Neubacher, D.; Mayers, D. Ritonavir-Boosted Tipranavir demonstrates superior efficacy to Ritonavir-Boosted protease inhibitors in treatment experienced HIV infected patients: 24 week results of the RESIST-2 Trial. **Clin. Infec. Diseases**. 2006; v.43, p. 1347-1356.

Campbell EM, Hope TJ. Live cell imaging of the HIV-1 life cycle.**Trends Microbiol**. 2008 Dec;16(12):580-7.

Ceccherini-Silberstein, F.; Malet, I.; Fabeni, L.; Dimonte, S.; Svicher, V.; D'Arrigo, R.; Artese, A.; Costa, G.; Bono, S.; Alcaro, S.; Monforte, A.; Katlama, C.; Calvez, V.; Antinori, A.; Marcelin, A.G.; Perno, C.F.. Specific HIV-1 integrase polymorphisms change their prevalence in untreated versus antiretroviral-treated HIV-1-infected patients, all naïve to integrase inhibitors. **J Antimicrob Chemother.** 2010; v.65, p.2305-18.

CHIN, Bum Sik. Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus. **Infection & Chemotherapy**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.1-9, 2017. Korean Society of Infectious Diseases and Korean Society for Chemotherapy (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.3947/ic.2017.49.1.1>.

CID-SILVA, Purificación et al. Initial treatment response among HIV subtype F infected patients who started antiretroviral therapy based on integrase inhibitors. **Aids**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.121-125, jan. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/qad.0000000000001679>.

Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. **N Engl J Med.** 2004 Mar 4; 350(10):1023-35. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra025195>.

CLUTTER, Dana S. et al. HIV-1 drug resistance and resistance testing. **Infection, Genetics And Evolution**, [s.l.], v. 46, p.292-307, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.031>.

COELHO, Luana Portes Ozorio et al. Prevalence of HIV-1 transmitted drug resistance and viral suppression among recently diagnosed adults in São Paulo, Brazil. **Archives Of Virology**, [s.l.], p.1-8, 20 dez. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-018-04122-8>.

Coffin JM. HIV viral dynamics. **AIDS.** 1996 Dec;10 Suppl 3:S75-84. Review.

Coffin, J. M.. Structure, Replication, and Recombination of Retrovirus Genomes: Some Unifying Hypotheses. **Journal Of General Virology**, v. 42, n.1, p.1-26, 1 jan. 1979. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-42-1-1>.

COUTSINOS, D. et al. Template Usage Is Responsible for the Preferential Acquisition of the K65R Reverse Transcriptase Mutation in Subtype C Variants of

Human Immunodeficiency Virus Type 1. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 83, n. 4, p.2029-2033, 10 dez. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01349-08>.

Delaugerre, C.; Rohban, R.; Simon, A.; Mouroux, M.; Tricot, C.; Agher, R.; Huraux, J.M.; Katlama, C.; Calvez, V..Resistance profile and crossresistance of HIV-1 among patients failing a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing regimen. **J Med Virol**. 2001; v.65, p.445-448.

DELGADO, Elena et al. Phylogeny and Phylogeography of a Recent HIV-1 Subtype F Outbreak among Men Who Have Sex with Men in Spain Deriving from a Cluster with a Wide Geographic Circulation in Western Europe. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 11, p.1-8, 24 nov. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0143325>.

DILERNIA, Dario A. et al. HIV Type 1 Genetic Diversity Surveillance among Newly Diagnosed Individuals from 2003 to 2005 in Buenos Aires, Argentina. **Aids Research And Human Retroviruses**, [s.l.], v. 23, n. 10, p.1201-1207, out. 2007. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.2007.0068>.

Espeseth AS, Felock P, Wolfe A, Witmer M, Grobler J, Anthony N, et al. HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000;97:11244–9.

FILY, F. et al. HIV-1 drug resistance testing at second-line regimen failure in Arua, Uganda: avoiding unnecessary switch to an empiric third-line. **Tropical Medicine & International Health**, [s.l.], v. 23, n. 10, p.1075-1083, out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tmi.13131>.

Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom JM, Groopman JE, Mildvan D, Schooley RT, et al The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. **N Engl J Med**. 1987; 23;317(4):185-91.

Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racanillo VR, Skalka AM. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control. 2004; Ed AMS Press, 627.

Frankel, A. D.; Young, J. A. T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA **Annu Rev Biochem.** 1998; 67: 1–25.

Gallo, R. C.. HISTORICAL ESSAY: The Early Years of HIV/AIDS. **Science**, v.298, n. 5599, p.1728-1730, 29 nov. 2002. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1078050>.

Gallo, R. C.; Montagnier, L.. HISTORICAL ESSAY: Prospects for the future. **Science**, v. 298, n. 5599, p.1730-1731, 29 nov. 2002. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1079864>.

Gelderblom, H.R.; Hausmann, E.H.; Ozel, M.; Pauli, G.; Koch, M.A. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. **Virology.** 1987; 156 (1): 171-6.

Göttlinger HG. HIV-1 Gag: A Molecular Machine Driving Viral Particle Assembly and Release. pp.2-28 HIV Sequence Compendium. Edited by: Kuiken C, Foley B, Hahn B, Marx P, McCutchan F, Mellors JW, Wolinsky S, Korber B. Publish by: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, LA-UR 0-2877. 2001.

GROSSMAN et al. Genetic variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C. **Aids**, London, v. 18, n. 6, p.909-915, abr. 2004.

HÄGGBLÖM, Amanda et al. Virological failure in patients with HIV-1 subtype C receiving antiretroviral therapy: an analysis of a prospective national cohort in Sweden. **The Lancet HIV**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.166-174, abr. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2352-3018\(16\)00023-0](http://dx.doi.org/10.1016/s2352-3018(16)00023-0).

HAHN, Beatrice H. et al. AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. **Science**, Usa, v. 287, n. 5453, p.607-614, 28 jan. 2000.

Hemelaar J, Elangovan R, Yun J, Dickson-Tetteh L, Fleminger I, Kirtley S, Williams B, Gouws-Williams E, Ghys PD; WHO–UNAIDS Network for HIV Isolation

Characterisation. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect Dis.* 2018 Nov 30. pii: S1473-3099(18)30647-9.

HU, W.-s.; HUGHES, S. H.. HIV-1 Reverse Transcription. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 10, p.1-22, 14 jun. 2012. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>.

Janssens, W.; Heindrickx, L.; Fransen, K.; Motte, J.; Peeters, M.; Nkengasong, J.N.; Ndunbe, P.M.; Delaporte, E.; Perret, J.L.; Atende, C.; Piot, P.; Van der Groen, G. Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in central Africa. **ARHR**, v.10, p. 877-9, 1994.

KANTOR, Rami et al. Pretreatment HIV Drug Resistance and HIV-1 Subtype C Are Independently Associated With Virologic Failure: Results From the Multinational PEARLS (ACTG A5175) Clinical Trial. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 60, n. 10, p.1541-1549, 13 fev. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ102>.

Korber, B.; Muldoon, M.; Theiler, J., Gao, F.; Gupta R.; Lapedes, A.; Hahn, B.H.; Wolinsky, S.; Bhattacharya, T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. **Science**. 2000; 288: 1789– 96.

Larder B, Richman D, Vella S. HIV Resistance and Implications for Therapy, 2nd ed., **MediCom Inc.**, Atlanta, 2001.

Levy, J.A..**HIV e a patogenia da Aids**. Editora Unifesp, 2010. Cap. 14, 363-380.

Lewinson, W. & Jawetz, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7ªed. Porto Alegre. Artmed. 2005. Cap.45, p 295-303.

Llibre, J.M.; Bonjoch, A.; Iribarren, J.; Galindo, M.J.; Negredo, E.; Domingo, P.; Pérez-Alvarez, N.; Martínez-Picado, J.; Schapiro, J.; Clotet, B. and HIV Conference Call Study Group. Targeting only reverse transcriptase with zidovudine/lamivudine/abacavir plus tenofovir in HIV-1-infected patients with multidrug-resistant virus: a multicentre pilot study. **HIV Med**. 2008; v.9,p.508-13.

LÓPEZ-CORTÉS, Luis F. et al. Effectiveness of Ritonavir-Boosted Protease Inhibitor Monotherapy in Clinical Practice Even with Previous Virological Failures to Protease Inhibitor-Based Regimens. *Plos One*, [s.l.], v. 11, n. 2, p.1-12, 12 fev. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0148924>.

MARTINEZ-PICADO, Javier; MARTÍNEZ, Miguel Angel. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor resistance mutations and fitness: A view from the clinic and ex vivo. **Virus Research**, [s.l.], v. 134, n. 1-2, p.104-123, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2007.12.021>.

MATSUDA, Elaine Monteiro et al. High Prevalence of Drug Resistance Mutations Among Patients Failing First-Line Antiretroviral Therapy and Predictors of Virological Response 24 Weeks After Switch to Second-Line Therapy in São Paulo State, Brazil. **Aids Research And Human Retroviruses**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.156-164, fev. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.2017.0052>.

McArthur RD, Novak RM. Reviews of anti-infective agents: maraviroc: the first of a new class of antiretroviral agents. **Clin Infect Dis**. 2008; 15;47(2):236-41.

McBurney S. P & Ross T M. Viral sequence diversity: challenges for AIDS vaccine designs. **Expert Rev Vaccines**. 2008; 7(9): 1405–17.

McCune, J. M.; Rabin, B. Linda; Feinberg, M.B.; Lieberman, M.; Kosek, J.C.; Reyes, G. R.; Weissman, I.L. Endoproteolytic Cleavage of gp160 Is Required for the Activation of Human Immunodeficiency Virus. **Cell**. 1988; 53: 55-67.

Melby, T.; Sista, P.; Demasi, R. Kirkland, T.; Roberts, N.; Salgo, M.; Snyder, G.H.; Cammack, N.; Matthews, T.J.; Greenberg, M.L. Characterization of Envelope Glycoprotein gp41 Genotype and Phenotypic Susceptibility to Enfuvirtide at baseline and on Treatment in the Phase III Clinical Trials TORO-1 and TORO-2. **AIDS Res. and Human Retr.**2006; v.22, p. 375-385.

MOLINA, Jean-michel et al. Once-Daily Atazanavir/Ritonavir Compared With Twice-Daily Lopinavir/Ritonavir, Each in Combination With Tenofovir and Emtricitabine, for Management of Antiretroviral-Naive HIV-1-Infected Patients: 96-Week Efficacy and Safety Results of the CASTLE Study. **J AIDS Journal Of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, [s.l.], v. 53, n. 3, p.323-332, mar. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/qai.0b013e3181c990bf>

Montagnier, L.. HISTORICAL ESSAY: A History of HIV Discovery. **Science**, v.298, n. 5599, p.1727-1728, 29 nov. 2002. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1079027>.

Moore JP, Doms RW. The Entry Inhibitors : a fusion of science and medicine. **PNAS**. 2003; 100(19): 10508-602

Morgan, D.; Ruscetti, F.; Gallo, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. **Science**, v. 193, n. 4257, p.1007-1008, 10 set. 1976. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.181845>

ORTIZ, Roberto et al. Efficacy and safety of once-daily darunavir/ritonavir versus lopinavir/ritonavir in treatment-naive HIV-1-infected patients at week 48. **Aids**, [s.l.], v. 22, n. 12, p.1389-1397, jul. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/qad.0b013e32830285fb>

PATON, Nicholas I. et al. Assessment of Second-Line Antiretroviral Regimens for HIV Therapy in Africa. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 371, n. 3, p.234-247, 17 jul. 2014. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1311274>.

PALMA, A. C. et al. HIV-1 protease mutation 82M contributes to phenotypic resistance to protease inhibitors in subtype G. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 67, n. 5, p.1075-1079, 13 fev. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks010>.

PERNAS, Berta et al. High prevalence of subtype F in newly diagnosed HIV-1 persons in northwest Spain and evidence for impaired treatment response. **Aids**, [s.l.], v. 28, n. 12, p.1837-1840, jul. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/qad.0000000000000326>.

Peterlin, B.M. Molecular biology of HIV. In. J. A Levy (ED.). **The Retr.**, New York: Plenum Press, 1995; v.4, p.185-238.

PLANTIER, Jean-christophe et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 15, n. 8, p.871-872, ago. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2016>.

Poveda E, Alcamí J, Paredes R, Córdoba J, Gutiérrez F, Llibre JM, Delgado R, Pulido F, Iribarren JA, García Deltoro M, Hernández Quero J, Moreno S, García F. Genotypic determination of HIV tropism - clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists. **AIDS Rev.**2010; 12(3): 135-48.

Prusiner SR. Discovering the Cause of AIDS. *Science*. 2002; 298: 1726-49.

RHEE, Soo-yon et al. HIV-1 pol mutation frequency by subtype and treatment experience: extension of the HIVseq program to seven non-B subtypes. **Aids**, [s.l.], v. 20, n. 5, p.643-651, mar. 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.aids.0000216363.36786.2b>.

RYOM, L et al. Highlights of the 2017 European AIDS Clinical Society (EACS) Guidelines for the treatment of adult HIV-positive persons version 9.0. **Hiv Medicine**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.309-315, 1 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/hiv.12600>.

SAHU, Gautam K..Potential Implication of Residual Viremia in Patients on Effective Antiretroviral Therapy. **Aids Research And Human Retroviruses**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.25-35, jan. 2015. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.2014.0194>.

Santos, N.S.O.; Romanos M.T.V; Wigg M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2ª Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2008. Cap.14, p 410-447.

SHAFER, Robert W. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance Mutations Update. **The Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 216, n. 9, p.843-846, 15 set. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jix398>.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H.. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-23, 1 set. 2011. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>.

STANFORD DATABASES. **Mutation Prevalence According to Subtype and Treatment**. Disponível em: <<https://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/MutPrevBySubtypeRx.cgi>>. Acesso em: 15 out. 2018.

Sutherland KA, Mbisa JL, Cane PA, Pillay D, Parry CM. Contribution of Gag and protease to variation in susceptibility to protease inhibitors between different strains of subtype B human immunodeficiency virus type 1. **The Journal of general virology**. 2014; 95:190–200.

Temin, H.M.; Mizutani, S. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. **Nature**, v. 226, n. 5252, p.1211-1213, jun. 1970. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/2261211a0>.

Thompson, M.A.; Aberg, J.A.; Hoy, J.F.; Telenti, A.; Benson, C.; Cahn, P.; Eron, J.J.; Günthard, H.F.; Hammer, S.M.; Reiss, P.; Richman, D.D.; Rizzardini, G.; Thomas, D.L.; Jacobsen, D.M.; Volberding, P.A.. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. **JAMA**. 2012; v.308; p.387-402.

THOMPSON; THOMPSON. Diversidade Genética Humana: Mutação e Polimorfismo. In: THOMPSON; THOMPSON. **Genética Médica**. New York: Elsevier, 2016. p. 42-56.

THOMPSON A., Jennifer et al. Evolution of Protease Inhibitor Resistance in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infected Patients Failing Protease Inhibitor Monotherapy as Second-line Therapy in Lowincome Countries: An Observational Analysis Within the EARNEST Randomized Trial. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 68, n. 7, p.1184-1192, 28 jul. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciy589>.

THOMSON, Michael M. et al. Rapid Expansion of a HIV-1 Subtype F Cluster of Recent Origin Among Men Who Have Sex With Men in Galicia, Spain. **J AIDS Journal**

Of Acquired Immune Deficiency Syndromes, [s.l.], v. 59, n. 3, p.49-51, mar. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/qai.0b013e3182400fc4>.

Tremblay, C.L. Combating HIV resistance – Focus on Darunavir. **Therap. and Clin. Risk Manag.** 2008; v.4(4), p.759-765, 2008.

TOULOUMI, Giota et al. Virologic and Immunologic Response to cART by HIV-1 Subtype in the CASCADE Collaboration. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 7, p.1-8, 30 jul. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071174>.

UNAIDS. Infográficos - Brasil. 2017. Disponível em: <https://unaids.org.br/wp-content/uploads/2015/06/20170720_DaDOS_unaids_Brasil.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2019

UNAIDS. **90-90-90 Uma meta ambiciosa de tratamento para contribuir para o fim da epidemia de AIDS**. 2015. Disponível em: <https://unaids.org.br/wp-content/uploads/2015/11/2015_11_20_UNAIDS_TRATAMENTO_META_PT_v4_GB.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2018.

Van Vaerenbergh, K. Prevalence of genotypic resistance among antiretroviral drug-naive HIV-1-infected patients in Belgium. **Antiviral Therapy**, Londres, v. 6(1), p.63-70, mar. 2001.

Varmus, H.E.; Swanstrom, R. Replication of retroviruses. In **RNA Tumor Viruses**. 1985: 75-134.

Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, Leonard CW, Bess JW Jr, Swanstrom R, Burch CL, Weeks KM. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. **Nature**.2009; 460(7256):711-6.

WHO (Comp.). **HIV/AIDS - Treatment and care**. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/hiv/topics/treatment/en/#>>. Acesso em: 15 set. 2018.

8. Anexos



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859 e-mail: cepial@ial.sp.gov.br



São Paulo, 17 de março de 2011.

Protocolo: 018/2011

Projeto de Pesquisa: "Resistência genotípica no resgate terapêutico de pacientes infectados pelo HIV com novas classes de antirretrovirais".

Pesquisador Responsável: Luis Fernando de Macedo Brígido

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião ordinária de 17 de março de 2011, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e suas resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/96 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL

1ª via – coordenador
2ª via - CEPIAL
LMT/dvmp